



# Système intégré pour l'encapsulation monocouche de cellules

Prisca Dalle

## ► To cite this version:

Prisca Dalle. Système intégré pour l'encapsulation monocouche de cellules. Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GRENS036 . tel-01235192

**HAL Id: tel-01235192**

**<https://theses.hal.science/tel-01235192>**

Submitted on 29 Nov 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie  
pour la biologie, la médecine, et l'environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Prisca Dalle**

Thèse dirigée par **Pierre-Yves Benhamou**  
codirigée par **Florence Rivera**

préparée au sein du **Laboratoire CEA-LETI/DTBS/LBCP**  
dans **l'École Doctorale EDISCE**

# Système intégré pour l'encapsulation monocouche de cellules

Thèse soutenue à huis clos le **17 décembre 2012**,  
devant le jury composé de :

**Mme Rosaria Ferrigno**

Professeur, Université Claude Bernard Lyon 1, Rapporteur

**Mme Séverine Sigrist**

Docteur, Centre européen d'étude du Diabète, Rapporteur

**M. Franz Bruckert**

Professeur, Université Grenoble INP, Examineur

**M. Jose Oberholzer**

Professeur, Université d'Illinois Chicago, Examineur

**Mme Florence Rivera**

Docteur, CEA/LETI, Encadrante CEA

**M. Pierre-Yves Benhamou**

Professeur, CHU Grenoble, Directeur de thèse





---

# REMERCIEMENTS

---

Je remercie Franz Brückert, d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Merci également à José Oberholzer d'être venu de Chicago pour ma soutenance et d'avoir permis la réalisation du premier essai préclinique. Enfin, merci à Rosaria Ferrigno et Séverine Sigrist, qui ont accepté d'être rapporteurs de mon manuscrit, pour leurs observations et leurs suggestions.

Je remercie toute l'équipe du DTBS du Léti, qui durant ces trois années de thèse, a su m'apporter son expertise et un grand soutien.

Je remercie mes encadrants. Tout d'abord, Pierre-Yves Benhamou, mon directeur de thèse, pour ces conseils et son enthousiasme envers ce projet. Merci également pour m'avoir donné la possibilité de partir en conférence internationale à Santa Clara pour présenter mes travaux.

Puis Florence Rivera, qui malgré sa charge de travail, m'a encouragée à aller jusqu'au bout et m'a challengée pour aboutir à un travail de qualité.

Merci tout spécialement aux techniciens du LBCP, car sans eux je n'aurais pas obtenu autant de résultats.

Amélie, merci pour ton travail en salle blanche, tes heures sup à cause d'idées farfelues, qui ont tellement bien marchées ! Plus personnellement, merci pour ton soutien au quotidien et ton dynamisme contagieux.

François, désolé pour les kilomètres de connectique que tu as dû monter pour ce projet.... Merci pour ta patience et ta réactivité sur tous les montages urgents que je t'ai donnés.

Manu et Gaël, merci pour votre implication et votre bonne humeur. C'est grâce à vous si une première implantation chez la souris a pu être réalisée !

Guillaume C, merci pour les millions de silanisation réalisées !

Merci également à tout le reste de l'équipe LBCP.

Fred et Fabrice, merci pour votre formation en culture cell, votre confiance et les baby-sittings de mRIN5-F et Jurkat quand je les abandonnais! Je regrette juste de louper la session Singstar chez Fabrice ...

Stéphane Litaudon et Simon Ledenmas, merci pour la formation au sécheur au CO2 supercritique et pour l'aide pour l'observation au MEB. Sébastien Penlou, merci pour la formation au broyeur et ta disponibilité !

Un grand merci également à Jean Berthier pour ses idées et son expertise en simulation. Dommage que notre collaboration ait dû s'arrêter après la première année.

Véronique B, merci !!!!! Pour toutes les démarches administratives, mais aussi parce que sans toi je n'aurais pas eu de salle de soutenance...

Toute ma gratitude à mes amis qui ont rendu ces trois années inoubliables (et pour leurs corrections du manuscrit, à chacun sa partie):

Milonchon, que dire ! Merci pour ton soutien, les bonnes crises de fous rires et le wcs.

LipidJo, merci pour les cafés, mais surtout pour ce superbe sourire.

Aurélie, merci ta bonne humeur.



Justin, surtout ne change pas, les cheveux sont parfaits !

Koc, merci pour le partage de la caméra rapide, un peu moins pour ton gâteau au sable ;)

Marconi, merci pour le temps que tu as consacré à la lecture de mon manuscrit de thèse et pour ton accent qui respire la bonne humeur.

Coussinet, merci pour tes blagues, tes chaussures ailées et NY !

Marjorie, j'aurais vraiment voulu voir l'exploit du tambourin...

Aurélien, merci pour les weekends à la Clusaz !

Lilou et Carole merci pour votre soutien particulièrement en fin de thèse, votre attention et votre don pour la cuisine ;)

Mes amis de PG ! Margot' (notre amitié est marquée à jamais sur une dalle), mes collocs Nours et Proton (le rose vous va si bien...), Alex (pour ton amitié et aussi ton hébergement à Lyon, sans lequel je n'aurais pas pu suivre ma formation DUOP), Maud, Juju, Steeve (à quand Bormes 2013 ?) et Pedro. Merci pour ces moments de détente ou sportifs, qui font que l'on peut réattaquer une nouvelle semaine de manips en forme !

Les amis, je vous aime TBTH.

Je remercie également Cassegrain pour sa ratatouille, qui m'a nourri pendant les derniers mois de rédaction...

Merci à mes parents, pour leur soutien au quotidien, leur amour et les nombreux appels qui vont avec ! Enfin, merci à mon Walid, l'homme nature, qui m'a constamment soutenue et poussée vers le haut avec un optimisme constant et que j'aime par-dessus tout.

À tous et à toutes, j'exprime toute ma reconnaissance.

---

# TABLE DES MATIERES

---

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>7</b>
--------------------------	----------

## **Chapitre I – Etat de l’art**

<b>I.1 LE DIABETE DE TYPE 1 ET SES TRAITEMENTS.....</b>	<b>15</b>
<b>I.2 LA MICROENCAPSULATION.....</b>	<b>20</b>
<b>I.3 LES TECHNIQUES DE MICROENCAPSULATION .....</b>	<b>31</b>
<b>I.4 AVANTAGE DE LA MICROFLUIDIQUE.....</b>	<b>51</b>
<b>I.5 POSITIONNEMENT DU PROJET DE RECHERCHE ET PRESENTATION DES OBJECTIFS.....</b>	<b>56</b>

## **Chapitre II – Matériel et méthodes**

<b>II.1 LE BANC EXPERIMENTAL ET LES COMPOSANTS MICROFLUIDIQUES.....</b>	<b>61</b>
<b>II.2 LA CULTURE CELLULAIRE.....</b>	<b>65</b>
<b>II.3 PROTOCOLE D’ENCAPSULATION DES CELLULES EN MICROSYSTEME .....</b>	<b>68</b>
<b>II.4 METHODE DE CARACTERISATION DES CAPSULES.....</b>	<b>70</b>

## **Chapitre III – Optimisation de la pré-gélification**

<b>III.1 ETUDE DE LA GELIFICATION EN BAIN EXTERNE.....</b>	<b>82</b>
<b>III.2 MISE EN FORME DES CRISTAUX D’ACETATE DE CALCIUM DANS LA PHASE HUILEUSE .....</b>	<b>88</b>
<b>III.3 IMPACT DES PROCEDES SUR LA VIABILITE CELLULAIRE.....</b>	<b>96</b>
<b>III.4 CONCLUSION.....</b>	<b>105</b>

## **Chapitre IV – Fonctionnement et optimisation du transfert de phase**

<b>IV.1 PRESENTATION DE LA PROBLEMATIQUE.....</b>	<b>109</b>
<b>IV.2 ETUDE DES DIFFERENTES GEOMETRIES DU MODULE DE TRANSFERT DE PHASE.....</b>	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>

<b>IV.3</b>	<b>ETUDE APPROFONDIE DU FONCTIONNEMENT DES GEOMETRIES OPTIMALES</b>	
	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.	
<b>IV.4</b>	<b>ETUDE DES PERFORMANCES DES SYSTEME POUR L'ENCAPSULATION DE CELLULES.....</b>	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
<b>IV.5</b>	<b>CONCLUSION.....</b>	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

## **Chapitre V – Carte fluidique**

<b>V.1</b>	<b>OPTIMISATION DE LA GEOMETRIE DU CANAL DE PRE-GELIFICATION.....</b>	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
<b>V.2</b>	<b>FONCTIONNEMENT DE LA CARTE FLUIDIQUE : IMPACT DE LA MODIFICATION DE LA CONNECTIQUE .....</b>	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
<b>V.3</b>	<b>PREMIERES EVALUATIONS DES PERFORMANCES ACTUELLES .....</b>	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
<b>V.4</b>	<b>CONCLUSION.....</b>	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

## **Chapitre VI – Vers l'implantation: caractérisation des capsules et biocompatibilité des procédés d'encapsulation**

<b>VI.1</b>	<b>CARACTERISATION DES PROPRIETES PHYSIQUES DES CAPSULES .....</b>	<b>125</b>
<b>VI.2</b>	<b>BIOCOMPATIBILITE DU PROCEDE D'ENCAPSULATION .....</b>	<b>129</b>
<b>VI.3</b>	<b>PREMIERS ESSAIS D'IMPLANTATION CHEZ DES SOURIS.....</b>	<b>135</b>
<b>VI.4</b>	<b>DISCUSSION ET CONCLUSION SUR CES PREMIERS ESSAIS .....</b>	<b>138</b>
	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>207</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>213</b>
	<b>ANNEXE 1.....</b>	<b>235</b>
	<b>ANNEXE 2.....</b>	<b>239</b>
	<b>ANNEXE 3.....</b>	<b>249</b>
	<b>ANNEXE 4.....</b>	<b>251</b>

---

# INTRODUCTION

---

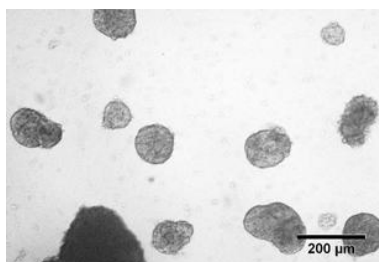


# Introduction

---

Le diabète touche aujourd'hui 347 millions de personnes à travers le monde. Selon les projections de l'OMS, ce nombre devrait doubler en 2030 [1]. Parmi ces 347 millions de personnes, 10% environ présentent un diabète de type 1.

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune. Chez les malades, les cellules  $\beta$  qui composent les îlots de Langerhans sont détruites par le système immunitaire. La destruction de ces cellules engendre un défaut de sécrétion d'insuline et donc une augmentation du glucose dans le sang (hyperglycémie). La Figure 1 montre des îlots de Langerhans humains. Ce sont des amas polydisperses de cellules, de 50  $\mu\text{m}$  à plus de 500  $\mu\text{m}$  de diamètre.



*Figure 1 – Îlots pancréatiques humains (fournis par le CHU de Grenoble)*

Depuis quelques années, de nouvelles technologies ont clairement amélioré le suivi de la maladie et ses traitements. Cependant, dans les cas de diabètes de type 1 sévères, ces derniers ne sont plus efficaces. Actuellement, la greffe d'îlots de Langerhans est un traitement possible proposé pour les cas les plus graves, mais il nécessite l'administration de traitements immunosuppresseurs avec de lourds effets secondaires. Depuis quelques années, la recherche se tourne vers le développement d'un concept alternatif : l'implantation d'îlots de Langerhans encapsulés dans des coques biocompatibles et poreuses. L'objectif est de rétablir la fonction de sécrétion d'insuline tout en évitant le rejet de la greffe et l'administration d'immunosuppresseurs.

Ce concept doit répondre à des problèmes de biocompatibilité complexes : le matériau utilisé ne doit pas être immunogène, la capsule formée doit avoir une bonne résistance mécanique et une perméabilité sélective. Il s'agit d'offrir à l'îlot une perfusion en oxygène et en nutriments tout en empêchant les cellules et les molécules du système immunitaire d'y pénétrer. Une des stratégies développées est la microencapsulation.

L'alginate est l'hydrogel majoritairement utilisé pour la microencapsulation [2], il est utilisé seul pour une encapsulation monocouche ou associé à des polyélectrolytes pour une encapsulation multicouche. La biocompatibilité requiert des formes sphériques et adaptées à la taille des îlots pour optimiser les phénomènes de diffusion au travers de la capsule. Les premiers essais précliniques et cliniques annoncent des résultats prometteurs. Cependant, il est souvent souligné que les essais actuels ne présentent aucune reproductibilité par manque de procédés standardisés de fabrication des capsules.

En effet, la fabrication des microcapsules est réalisée par des techniques macroscopiques avec des procédés manuels, qui consistent à faire une goutte à goutte de la suspension cellulaire d'alginate dans un bain gélifiant. Le lot de capsules fabriqué n'est donc pas homogène : la première capsule formée n'a pas le même temps de gélification que la dernière. De plus, le second inconvénient de ces techniques est qu'elles ont des limites importantes de fonctionnement. Il est difficile de combiner sphéricité, monodispersité, contrôle de la taille des capsules et utilisation d'une solution d'alginate à haute viscosité (garante des propriétés mécaniques des capsules).

# Introduction

La microfluidique permet de former des émulsions monodisperses de taille contrôlée et qui offre des possibilités multiples pour la manipulation de gouttes et de particules. Depuis une vingtaine d'années, la recherche microfluidique appliquée au domaine de l'encapsulation de cellules se développe. L'objectif du projet CELLENC au CEA-LETI est de mettre au point une plateforme d'encapsulation microfluidique et instrumentée qui permettrait aux cliniciens d'encapsuler rapidement et de façon reproductible, des îlots directement après leur isolement, puis de les implanter chez les patients diabétiques.

Ce projet de recherche s'inscrit dans cette dynamique. L'objectif est de développer un consommable fluidique permettant d'automatiser le procédé d'encapsulation monocouche de cellules dans de l'alginate.

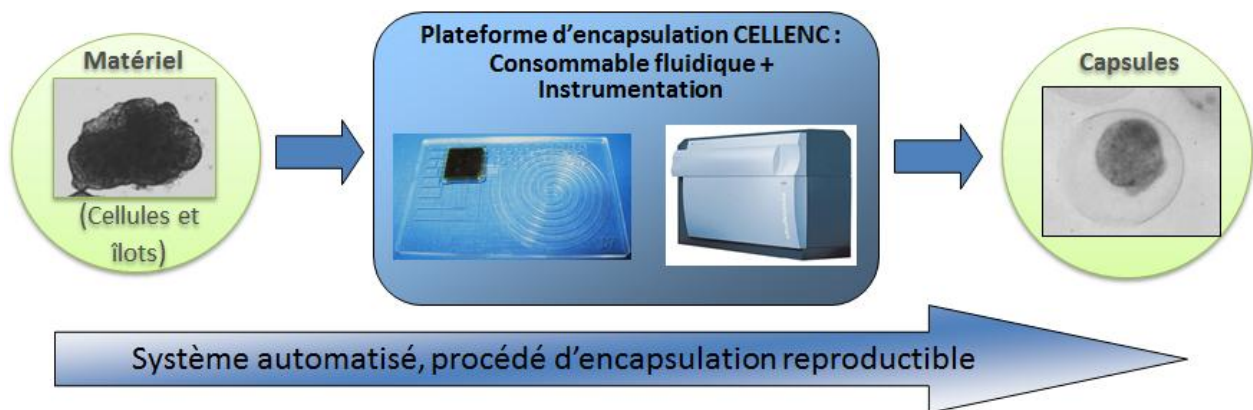


Figure 2 – Objectif du projet CELLENC développé au CEA-LETI : Plateforme instrumentée d'encapsulation pour le traitement du diabète de type 1.

Le cahier des charges d'un tel système est conséquent puisqu'il doit remplir les conditions détaillées ci-dessous :

- Les capsules récupérées en sortie doivent être sphériques et monodisperses.
- Le procédé d'encapsulation employé ne doit pas être toxique pour les cellules encapsulées.
- Le lot de capsules produit doit être exempt de trace d'huile. Au contraire des techniques macroscopiques, en microfluidique, les gouttes sont initialement produites dans un flux continu d'huile. Même si l'huile utilisée lors de l'encapsulation des cellules est biocompatible (de grade pharmaceutique), il est préférable de s'assurer de la propreté des capsules en fin de procédé.
- Les capsules doivent être récupérées dans du sérum physiologique<sup>1</sup>. Ceci afin de pouvoir implanter les capsules directement en sortie de système sans lavage supplémentaire.
- La fréquence de production des capsules doit être la plus grande possible. Pour des essais cliniques, la contrainte est la production de 200 000 capsules en 3h, ce qui représente une fréquence de génération de gouttes de 1100 gouttes/minute. Cette fréquence est importante mais l'avantage des microsystèmes est qu'ils peuvent fonctionner en parallèle. L'objectif de 400 gouttes/minute semble raisonnable et nécessiterait le fonctionnement en simultané de 3 ou 4 dispositifs.

<sup>1</sup> Les concentrations ioniques considérées sont 150 mM NaCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>.

# Introduction

Pour répondre à ce cahier des charges, un microsystème avec plusieurs fonctions fluidiques a été conçu. Le schéma Figure 3 reporte les différents modules et leur enchainement. Le fonctionnement de ces modules sera décrit au cours des différents chapitres de ce manuscrit.

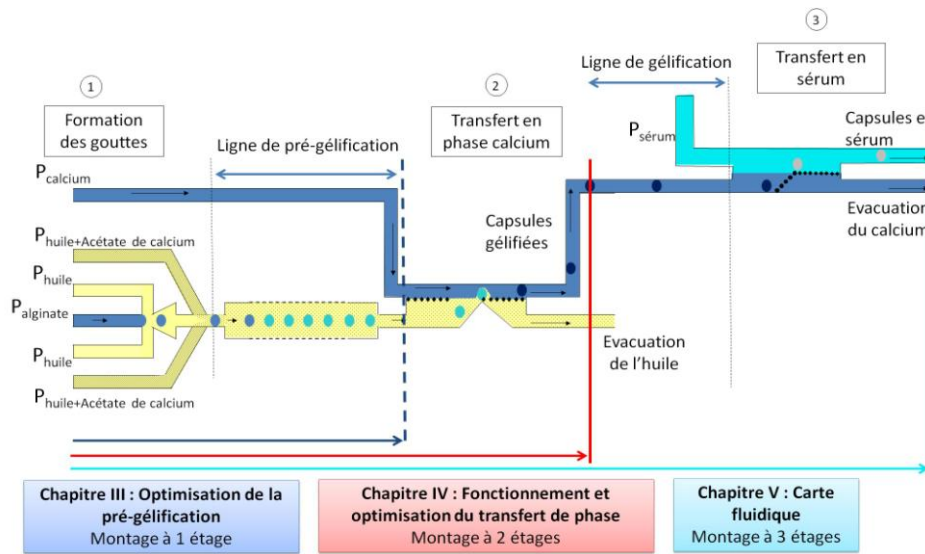


Figure 3 – Représentation schématique des différentes fonctions présentes dans le microsystème. Le microsystème est contrôlé en pression.

Le chapitre I présente l'état de l'art sur la microencapsulation et plus particulièrement les avancées en microfluidique dans le domaine de l'encapsulation de cellules.

Le chapitre II décrit le matériel et les méthodes utilisés tout au long de ce projet pour mettre au point ce système d'encapsulation et réaliser les premiers tests d'encapsulation de cellules ainsi que les premières caractérisations des capsules.

Puis, les chapitres suivent l'enchainement des modules représentés sur la Figure 3.

Le chapitre III présente la mise au point du procédé de gélification utilisé tout au long de ce projet. Pour réaliser cette optimisation, un système microfluidique simple de formation de gouttes en MFFD (Micro Flow Focusing Device) est utilisé. La mise au point de ce procédé de pré-gélification est nécessaire pour faire fonctionner le module de transfert de phase présenté dans le chapitre suivant.

Le chapitre IV présente le module clé de l'automatisation du procédé d'encapsulation monocouche, car il permet de transférer les gouttes de la phase huileuse vers la phase aqueuse gélifiante. Ce chapitre présente les différentes géométries de transfert testées ainsi que leurs performances concernant la stabilisation de l'interface, le rendement de transfert, la fréquence de production des gouttes et la sphéricité des capsules obtenues.

Le chapitre V présente la carte fluidique permettant l'automatisation du procédé d'encapsulation monocouche complet. Cette carte intègre trois fonctions : la production de gouttes monodisperses, leur transfert en phase de calcium et leur transfert en phase à concentration physiologique. L'évaluation du fonctionnement et des performances actuelles de ce système sont l'objet de ce chapitre.

Le chapitre VI présente les premières caractérisations des capsules issues des systèmes à deux et à trois étages avec une gélification automatisée. Ces caractérisations portent sur la résistance mécanique et la porosité des capsules et sur la viabilité des cellules encapsulées. Des premiers résultats d'implantation chez le rongeur sont également reportés.





---

## I - ETAT DE L'ART

---



## I.1 LE DIABETE DE TYPE 1 ET SES TRAITEMENTS

### I.1.1 Les traitements actuels

---

Le traitement fréquent pour le diabète de type 1 consiste en des injections quotidiennes d’insuline. Cependant, le suivi de la maladie et les traitements se sont nettement améliorés ces dernières années. Depuis peu, de nouvelles techniques permettent le couplage entre suivi en temps réel du taux de glucose et injection (au stylo) ou perfusion d’insuline (pompe à insuline) [3]. Le patient peut désormais adapter ses injections en insuline au cours de la journée en fonction de ses besoins. Des dispositifs qui adaptent l’injection d’insuline directement en fonction du taux de glucose sanguin (pancréas artificiel) commencent à apparaître mais ne sont pas encore au point [4].

Ces nouveaux traitements atténuent les complications chroniques dues à la maladie en évitant au quotidien des variations trop importantes de glucose et des crises d’hypoglycémie. Cependant, même avec ce traitement, il est difficile de reproduire exactement le dosage naturel ainsi que le rôle complet et complexe de l’hormone. Ainsi, dans les cas de diabète sévère, les injections d’insuline ne suffisent plus à réguler correctement le taux de glycémie. Il a donc fallu mettre au point des traitements alternatifs.

La première révolution depuis une trentaine d’années est la greffe d’îlots de Langerhans. Cette forme de thérapie a commencé à donner des résultats prometteurs depuis la mise au point du protocole d’Edmonton [5][6] dans les années 2000. Contrairement à la greffe d’un pancréas entier, qui impose une opération chirurgicale lourde et risquée, les îlots isolés sont injectés directement dans la veine du foie. Une étude réalisée à Lille [7] sur 14 patients indique que 11 patients gardent leur insulino-indépendance pendant 3 à 6 ans dont 8 patients sans besoin d’aucune injection d’insuline. Environ 550 greffes ont été réalisées suivant ce protocole dans plus de 40 institutions [8]. Le suivi des différentes implantations au cours des dix dernières années montre une nette amélioration de l’efficacité des greffes : les implantations réalisées entre 1999 et 2002 ont permis une insulino-indépendance de 3 ans pour 27% des cas contre 44% des cas pour les implantations réalisées entre 2007 et 2010 [9].

Cette thérapie prometteuse présente cependant de nombreux inconvénients :

- L’administration d’un traitement immunosuppresseur pour éviter le rejet de greffe. Ce traitement a des effets secondaires importants comme l’apparition d’infections opportunistes et de tumeurs à cause d’un système immunitaire affaibli [10].
- Le manque d’îlots par manque de donneurs. La quantité d’îlots nécessaire à une greffe est d’environ 11 000 IEQ/kg<sup>2</sup> [11], ce qui peut parfois nécessiter jusqu’à trois greffes. L’implantation doit être réalisée rapidement après l’isolation car les îlots se détériorent très vite en culture. Ainsi, en fonction du nombre d’îlots isolés, plusieurs greffes sont parfois nécessaires pour un même patient [9]. Dans le but d’améliorer le traitement des patients et de combler le manque d’îlots, deux axes d’investigation sont actuellement menés :

---

<sup>2</sup> IEQ : Unité de mesure des tailles des îlots. 1 IEQ représente un îlot d’une taille de 150µm

- Pour éviter les traitements immunosuppresseurs, un nouveau concept est apparu. Il s’agit d’implanter des îlots encapsulés dans des capsules biocompatibles et poreuses afin de prévenir le rejet de greffe tout en gardant des îlots fonctionnels.
- Les îlots sont des amas rares et fragiles, les chercheurs s’activent donc pour trouver des formes alternatives pouvant les remplacer. Les cellules souches sont une source possible de nouvelles cellules pancréatiques. Certaines études ont permis de différencier des cellules souches afin qu’elles répondent à la stimulation de glucose par une sécrétion d’insuline [13]. D’autres molécules induisant cette différenciation sont en cours de développement [14]. D’autre part, des cellules isolées du pancréas peuvent également être stimulées pour reformer des îlots in vitro [15].  
La xéno-transplantation est aussi une solution proposée. Elle consiste à implanter des îlots d’une espèce chez une autre. Ce sont les îlots de porc qui sont utilisés pour des essais d’implantation chez l’homme. Cependant, en plus des problèmes de rejet de greffe, ce concept induit un risque important de transmission d’infections inter-espèce [16].

Dans la suite de ce chapitre de présentation, nous exposons essentiellement les nouveaux développements concernant le premier point, soit l’encapsulation des îlots de Langerhans comme traitement alternatif au diabète de type 1.

### I.1.2 Traitement alternatif : implantation d’îlots de Langerhans encapsulés

#### I.1.2.1. LE PRINCIPE

Le principe d’encapsulation est apparu en 1964 avec l’équipe de Chang et al. [17]. L’article présente l’encapsulation d’une solution de protéines dans une capsule de polymère. Ce principe a été ensuite adapté pour l’encapsulation de cellules dans le but de développer des thérapies cellulaires innovantes.

Le concept d’immuno-isolation consiste à transplanter chez le patient des îlots fonctionnels protégés par une coque de polymère biocompatible et poreuse (Lim et Sun [18]). L’insuline est sécrétée au travers de la capsule et l’îlot masqué n’active pas le système immunitaire. L’avantage de cette protection est d’assurer une thérapie sans administration d’immunosuppresseur [19][20]. Le terme de pancréas bioartificiel est aussi utilisé pour désigner ce concept.

Pour que les cellules de l’îlot restent fonctionnelles, la capsule utilisée doit avoir plusieurs propriétés [21][22]. Le matériau ne doit pas être immunogène et doit avoir une bonne résistance mécanique ainsi qu’une porosité contrôlée. Ce polymère doit faire barrière au système immunitaire (cellules, anticorps et autres molécules) mais doit laisser circuler librement le glucose, l’oxygène, les nutriments et bien sûr l’insuline produite (Figure 4). Le terme de perméabilité sélective est utilisé pour définir cette propriété.

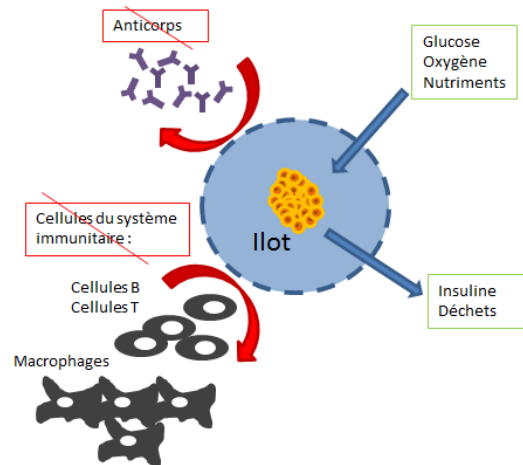


Figure 4 – Principe de l’encapsulation de cellules.

Ce nouveau traitement très prometteur a suscité l’intérêt de nombreuses équipes au cours de ces trente dernières années. C’est ce que montre le graphique Figure 5 où est tracée l’évolution du nombre de publications sur ce sujet. Toutes les publications ne sont pas référencées sur cette base bibliographique mais cela montre bien la tendance. La recherche bibliographique a été menée pour la phrase « encapsulation and islet\* and diabet\* » sur le site gopubmed [23].

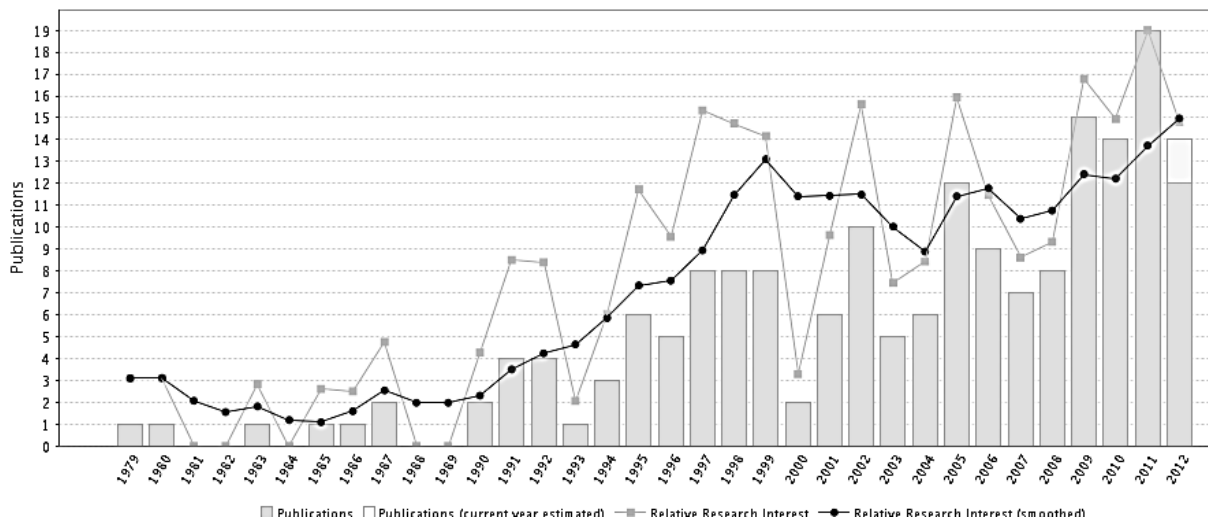


Figure 5 – Nombre de publications par an sur l’encapsulation d’îlots de Langerhans depuis 1980.

## I.1.2.2. LES DIFFERENTS TYPES D’ENCAPSULATION

Il existe actuellement trois types d’encapsulation qui seront décrits succinctement sur la base de plusieurs revues [21][24].

### I.1.2.2.1. La macroencapsulation

La macroencapsulation consiste à encapsuler l’ensemble des îlots dédiés à la greffe dans une poche commune de dimension macroscopique, en général de l’ordre du centimètre. La poche peut être intravasculaire ou extravasculaire. Cependant, les risques de thrombose<sup>3</sup> pour un système

<sup>3</sup> Formation d’un caillot sanguin

intravasculaire sont élevés [25], le système extra vasculaire est donc préféré. Ce système est fabriqué en polymère (alginate, agarose) ou en thermoplastique (PAN-PVC...). La géométrie de la chambre est variée : cylindrique [26], en feuille [27]...

Les inconvénients majeurs de ce type d’encapsulation sont : la taille, l’épaisseur et la géométrie du système. La taille imposante du dispositif restreint l’implantation à la cavité péritonéale [28]. Cet endroit est mal irrigué et propice à une forte réaction immunitaire [29]. La membrane, souvent épaisse, et la géométrie limitent la diffusion homogène de l’oxygène et des nutriments dans l’ensemble de la poche, ce qui induit la nécrose des îlots [30][31]. Des équipes travaillent actuellement à promouvoir une meilleure vascularisation du système afin que les îlots soient tout de suite bien irrigués après l’implantation [32]. Les atouts de ces macrosystèmes sont une bonne résistance mécanique et la possibilité d’explanter facilement le système en cas de problème ou pour le recharger en îlots.

Des start-up commencent à être montées sur le sujet, comme Theracyte, ou Defymed issues du CEED (Centre Européen d’Etude du Diabète) de Strasbourg qui développent ce type de macropoches implantables, dispositifs qui entrent prochainement en phase préclinique chez le gros animal [33].

### *1.1.2.2.2. La microencapsulation*

La microencapsulation est l’encapsulation d’un ou de maximum deux îlots dans une capsule d’une taille inférieure à 500  $\mu\text{m}$ . C’est Lim et Sun en 1980, qui les premiers démontrent la faisabilité de ce concept en implantant des îlots encapsulés chez des rats [18]. Le taux de glucose a été régulé pendant 3 semaines. Les hydrogels sont les matériaux majoritairement utilisés pour la formation des capsules (1.2.1).

Cette méthode présente de multiples avantages par rapport à la macroencapsulation. La taille plus petite permet une optimisation des phénomènes de diffusion. En effet, la distance entre le milieu extérieur et l’îlot encapsulé est plus faible [34]. La forme sphérique limite les réactions immunitaires par l’absence d’angle sur la surface [35]. Le volume total de l’implant est plus petit, la chirurgie est alors minimale et l’accès à d’autres sites d’implantations est possible avec des capsules de l’ordre de 300  $\mu\text{m}$  [36].

Par rapport à la macroencapsulation, la microencapsulation présente des insuffisances d’un point de vue mécanique. Les capsules ont une résistance mécanique et une stabilité à long terme faibles, qui doivent être améliorées, d’autant plus que, la rupture d’une seule capsule peut entraîner la perte de l’ensemble du greffon en attirant le système immunitaire [37]. D’autre part, récupérer la totalité des capsules en cas de problème est une tâche difficile contrairement à une poche macroscopique.

Les contraintes de biocompatibilité pour ces deux premiers types d’encapsulation sont complexes et seront développées plus en détails dans le paragraphe 1.1.3.

### *1.1.2.2.3. La nanoencapsulation*

La nanoencapsulation, ou revêtement conforme, consiste à déposer des couches de polymères ou de polyélectrolytes successives directement sur les îlots [38]. Le but est de minimiser la distance entre l’îlot et le milieu extérieur afin d’avoir un système très réactif aux besoins en insuline du patient. Le volume de l’implant est considérablement réduit comparé aux autres types d’encapsulation.

Cependant, les résultats sont controversés quant à l’efficacité de la protection contre le système immunitaire hôte [39][40].

### 1.1.3 Le problème complexe de la biocompatibilité

Actuellement, le défi est de trouver un procédé d’encapsulation qui préserve les îlots encapsulés tout en évitant une réaction immunitaire chez l’hôte. Sur les premiers essais d’implantation réalisés depuis une trentaine d’années, les échecs de la greffe ont été identifiés comme étant dus à plusieurs facteurs :

- Un manque de biocompatibilité des capsules. La reconnaissance de la capsule par le système immunitaire peut être due au matériau lui-même. Suivant la composition de la capsule, la pureté de l’alginate utilisé, la forme de la capsule, la rugosité de surface (présence de cratères, bosses), le système immunitaire peut enclencher une inflammation chronique et conduire à la formation de fibrose<sup>4</sup> [37]. La présence de ce tissu diminue la porosité de la capsule et empêche progressivement la diffusion des nutriments et de l’oxygène, provoquant la perte progressive du greffon [41].

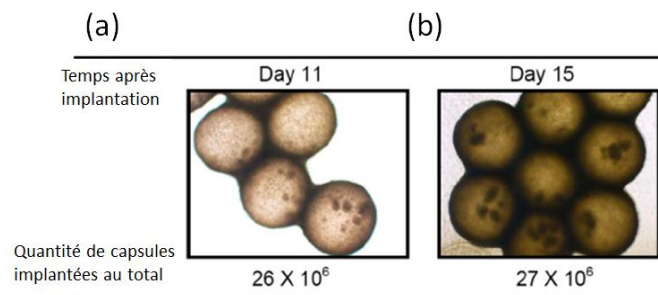


Figure 6 – Îlots encapsulés dans des billes de calcium-alginate-PLL retirées de la cavité péritonéale de souris NOD<sup>5</sup>, a) Capsules collectées 11 jours après implantation, b) Capsules collectées 15 jours après implantation[42].

- Une immuno-protection incomplète des îlots. Le système immunitaire peut reconnaître l’îlot par la présence d’antigènes visibles et s’activer. C’est notamment le cas lors de protrusion<sup>6</sup> d’îlot en dehors de la capsule [37] ou d’une porosité trop importante qui ne masque pas efficacement l’îlot. Les déchets que rejette l’îlot attirent également le système immunitaire. Cette activation conduit aussi à la formation de fibrose autour des capsules (Figure 6).
- Une inflammation aiguë à la suite de l’acte chirurgical de l’implantation. Il est estimé que 40% des îlots initialement implantés meurent dans les premières semaines après l’implantation [43]. Pourtant à ce stade, seulement 10% des capsules sont recouvertes de fibrose. D’autres phénomènes entrent donc en jeu. A cause de l’acte chirurgical, le système immunitaire est attiré vers le lieu de l’implantation. Les cytokines et autres petites molécules du système immunitaire, alors en forte concentration, diffusent au travers de la membrane et endommagent les cellules encapsulées. En effet, certaines de ces molécules sont du même poids moléculaire que les nutriments et l’oxygène. Même avec une porosité réduite et

<sup>4</sup> Surcroissance cellulaire

<sup>5</sup> NOD : Pour « Non Obese Diabetic », souris qui développe spontanément un diabète de type 1.

<sup>6</sup> Îlot sortant de sa capsule, visible du système immunitaire.



contrôlée, il est impossible d’empêcher leur diffusion [44]. Cependant, de nouvelles recherches visent à utiliser la capsule pour y incorporer des agents anti-inflammatoires qui diffusent pendant une courte période juste après l’implantation. Des résultats prometteurs ont été obtenus avec le kétoprofène [45] et l’ibuprofène [46].

- Une distance entre l’îlot et le réseau sanguin trop importante. Des nécroses centrales sont observées dues à une mauvaise perfusion des îlots. La majorité des implantations se fait dans la cavité péritonéale, historiquement utilisée par Lim and Sun [18]. A cet endroit, les îlots ne sont pas directement en contact avec le flux sanguin mais sont alimentés par une diffusion passive. Une revascularisation préopératoire ou la recherche d’un autre lieu d’implantation mieux vascularisé sont des pistes à explorer pour remédier ce problème [37]. Le lieu d’implantation choisi dépend surtout du volume de capsules à implanter.

A ce jour de nombreuses études sont menées pour répondre à ces problèmes de biocompatibilité et pour comprendre de façon plus approfondie leurs causes et leurs conséquences. Pour y arriver, De Vos [47] souligne la nécessité de caractériser précisément les capsules produites car actuellement, il y a un manque de reproductibilité important des résultats entre laboratoires et entre procédés d’encapsulation utilisés. Il s’agit donc de mettre au point des procédés standards de fabrication et de caractérisation des capsules pour avancer plus rapidement sur cette thématique avec des problèmes de biocompatibilité complexes.

## I.2 LA MICROENCAPSULATION

Le travail de cette thèse concerne la microencapsulation. La suite de ce chapitre approfondit donc cette technique, en décrivant les polymères utilisés et leur influence sur la résistance mécanique, la porosité des capsules produites ainsi que sur la biocompatibilité des capsules.

Les microencapsulations sont réalisées en majorité dans des hydrogels, soit dans un réseau tridimensionnel de chaînes de polymères hydrophiles et réticulées. L’hydrogel le plus utilisé et étudié pour les encapsulations de cellules est l’alginate [48][2][49]. Il peut être utilisé seul en encapsulation monocouche (I.2.1), ou combiné avec des polyélectrolytes en encapsulation multicouche (I.2.2).

### I.2.1 Encapsulation monocouche dans l’alginate

---

#### I.2.1.1. PRESENTATION DE L’ALGINATE

L’alginate est un polysaccharide anionique produit principalement par les algues brunes. Une forme similaire est également produite par des bactéries: les *Pseudomonas*. C’est un copolymère composé de deux monomères, le mannuronate (ou acide mannuronique noté M) et le guluronate (ou acide guluronique noté G) représentés Figure 7. Les monomères M et G sont distribués le long de la chaîne de polymère en différents blocs : bloc M, bloc G et bloc MG (Figure 7). La proportion et la distribution de chaque bloc et des monomères varient suivant la provenance de l’alginate et est déterminante pour de nombreuses propriétés physico-chimiques des capsules formées [50]. En effet, suivant la composition de l’alginate, les interactions (forces de Van Der Waals, forces électrostatiques...) qui interviennent au moment de la formation de la capsule sont différentes.

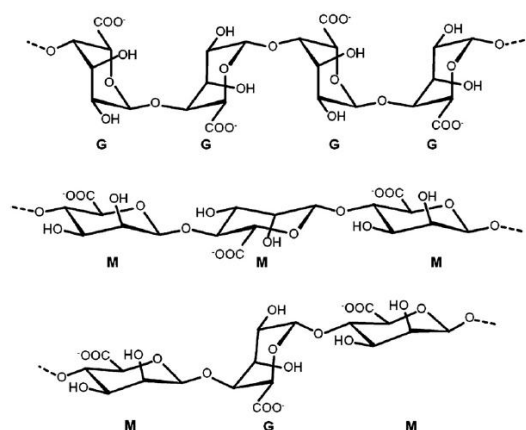


Figure 7 - Composition et enchainement des blocs d'alginate [49].

Aucun alginate n'est identique, il est caractérisé par la proportion de chacun des monomères (rapport G/M), la répartition des blocs, par son poids moléculaire  $M_w$  et par son indice de polydispersité<sup>7</sup> ( $M_w/M_n$ ), où  $M_n$  est la moyenne des masses molaires des chaînes du polymère pondérée par le nombre de chaînes de cette longueur. L'enchainement des blocs est déterminé par H-RMN [51][52] et le rapport ( $M_w/M_n$ ) par chromatographie à exclusion stérique ou par diffusion de la lumière multi-angles [53].

## I.2.1.2. LE PROCESSUS DE GELIFICATION DE L'ALGINATE

L'alginate de sodium se présente sous la forme d'une poudre. Cette poudre est diluée dans une solution aqueuse à la concentration voulue. En présence d'ions divalents (calcium  $Ca^{2+}$ , baryum  $Ba^{2+}$ , cuivre  $Cu^{2+}$ ....), cette solution d'alginate gélifie en formant des liaisons ioniques non covalentes entre l'ion divalent et les chaînes du polymère. L'affinité est différente selon l'ion utilisé et cela se reflétera dans la qualité du gel formé (notamment sur les propriétés mécaniques et la porosité du gel – cf. I.2.1.3.1).

Dans tous les cas, le processus de gélification est décrit par le modèle dit « egg-box » (Figure 8)[54]. L'ion divalent est enfermé dans une coque d'acide guluronique G. La formation d'une liaison requiert 8 à 20 monomères pour un ion divalent. Le nombre de monomères nécessaire diminue lorsque l'affinité pour l'ion divalent augmente.

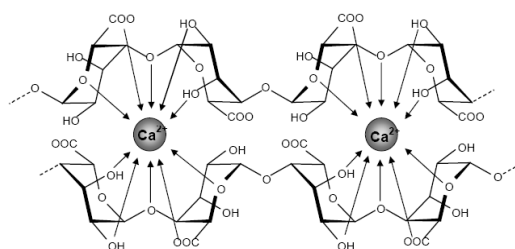


Figure 8 - Le model dit « egg-box » [54].

Ce procédé de gélification est rapide et non toxique pour les cellules car il peut être réalisé à pH physiologique sans source de polymérisation extérieure (exposition aux ultra-violets, variation de

<sup>7</sup> Variation en taille des chaînes de polymères

température...). Cela explique pourquoi l’alginate reste le polymère le plus utilisé pour l’encapsulation de cellules.

### I.2.1.3. LES PROPRIETES DES MICROCAPSULES AVEC UNE ENCAPSULATION MONOCOUCHE D’ALGINATE

Les propriétés des capsules formées dépendent de trois facteurs : la structure de l’alginate choisi, le procédé de gélification et la technique d’encapsulation. Dans ce paragraphe, nous décrivons l’influence des deux premiers facteurs sur la résistance mécanique et la porosité des capsules. L’influence de la technique d’encapsulation sera plus longuement détaillée dans la partie 3.

#### I.2.1.3.1. La résistance mécanique

La résistance mécanique des capsules est un paramètre clé. Une fois implantées, les capsules doivent résister aux sollicitations mécaniques *in vivo*, ce qui découvrirait l’îlot et enclencherait une réaction immunitaire. Les sollicitations mécaniques sont de deux ordres : résistance au cisaillement (Lacik [55] évalue la contrainte mécanique à 10 grammes/capsule dans la cavité péritonéale) et résistance au gonflement osmotique.

Le gonflement osmotique est un phénomène qui provient de la différence de concentration en ions mobiles à l’intérieur et à l’extérieur d’une structure poreuse. A l’intérieur de la capsule, la macromolécule d’alginate chargée ne peut diffuser au travers de la membrane. Ce sont alors les ions extérieurs qui entrent dans la capsule pour équilibrer les charges (se reporter équilibre de Donnan [56] pour plus d’informations). Ce phénomène s’accompagne donc d’une entrée d’eau dans la capsule, créant ainsi une surpression qui fait gonfler la capsule, augmenter la porosité, jusqu’à parfois éclater la structure [57].

De plus, les liaisons entre l’alginate et les ions gélifiants sont réversibles en présence d’ions chélateurs (citrate ou EDTA<sup>8</sup>) ou en présence d’ions non gélifiants comme le sodium. En conditions physiologiques, la forte concentration d’ions sodium par rapport à la concentration en ions calcium conduit à un remplacement progressif des ions calcium, peu liés à la structure du gel, par des ions sodium. Ce phénomène induit une augmentation de la porosité et une liquéfaction progressive du cœur de la capsule jusqu’à parfois une dissolution complète. Le gonflement osmotique est la principale cause de rupture des capsules en milieu physiologique [58] qui limite l’utilisation de l’encapsulation monocouche *in vivo*.

La résistance du gel au cisaillement et au gonflement osmotique dépend principalement de la qualité et de la densité des liaisons entre les chaînes de polymères et les ions gélifiants. Cela varie en fonction de la composition de l’alginate mais également des conditions expérimentales de gélification (concentration de l’alginate, type et concentration des ions gélifiants...).

La qualité des liaisons est influencée par :

- Le rapport G/M. La structure en « egg-box » présentée précédemment a montré que seul l’acide G formait des liaisons avec les ions gélifiants. Les gels formés sont plus résistants lorsque leur composition en G augmente. Au contraire, les gels formés avec des alginates ayant un fort taux de M sont connus pour être plus élastiques et plus souples [59].

---

<sup>8</sup> EDTA : acide éthylène diamine tetra acétique

- Le choix de l’ion gélifiant. La résistance mécanique des gels dépend de l’affinité du polymère avec l’ion gélifiant choisi [60][61]. L’affinité suit l’ordre suivant  $Mg^{2+} < Ca^{2+} < Sr^{2+} < Ba^{2+}$ . Cependant, dans le cadre de l’encapsulation de cellules, il faut aussi prendre en compte la toxicité de l’ion. Ainsi, c’est l’ion calcium, le moins toxique, qui est actuellement le plus utilisé. De plus en plus d’équipes utilisent l’ion baryum. En effet, les gels formés sont plus rigides et résistants au gonflement osmotique [62] mais les résultats sur la viabilité cellulaire sont mitigés et controversés [63]. Le compromis est l’utilisation d’un mélange d’ions calcium avec une faible concentration d’ions baryum (de l’ordre 1 mM), ce qui améliore déjà largement les propriétés mécaniques du gel formé [62].

La densité du réseau est influencée par :

- La concentration de la solution initiale d’alginate. Une concentration plus importante donne un réseau plus dense et donc une meilleure résistance mécanique [64][58].
- La répartition de la concentration en alginate au sein de la capsule. La composition ionique de la solution de dilution de l’alginate et de la solution gélifiante a une importance sur la répartition finale de l’alginate dans la capsule. Deux types de capsules peuvent être obtenus : des capsules avec une répartition homogène de l’alginate et des capsules avec une répartition inhomogène (Figure 9)[65]. Pour une distribution inhomogène, la concentration d’alginate est plus importante sur la périphérie de la capsule, cette distribution est obtenue lorsque le NaCl est omis dans la solution d’alginate et dans la solution gélifiante [66][62] et la concentration en calcium utilisée est basse ( $< 50$  mM). Une distribution homogène est obtenue en ajoutant du NaCl. Les gels à répartition inhomogène sont souvent préférés car plus résistants au gonflement osmotique et moins poreux [67][28].
- La concentration en ions gélifiants du bain. Plus la concentration de ce bain est importante, meilleure est la résistance mécanique [58].
- Le temps de gélification. C’est un sujet controversé, pour certaines équipes ce paramètre influence la résistance mécanique [58][67], pour d’autres ce n’est pas le cas. Par exemple, il a été montré sur des capsules d’alginate de baryum que le temps de gélification n’influait ni la rigidité, ni la porosité des capsules et les rendait même plus cassantes [68].

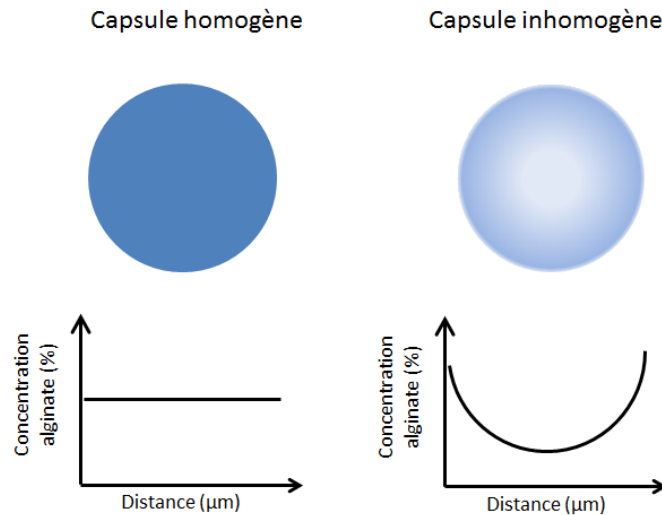


Figure 9 – Répartition de la concentration d’alginate au sein de la capsule [28].

### 1.2.1.3.2. La porosité

Une des causes de la formation de fibrose autour de la capsule est une porosité trop importante. Dans ce cas, les antigènes des îlots sont visibles au travers de la capsule ce qui provoque une réaction immunitaire et une pénétration des molécules du système immunitaire dans la capsule. La porosité des gels est fortement liée à la résistance au gonflement osmotique. Lorsque les capsules gonflent, leur porosité augmente. Aussi, les mêmes influences sont donc retrouvées que celles observées pour le gonflement osmotique.

### 1.2.1.4. LES AUTRES MATERIAUX TESTES

Beaucoup d’autres matériaux synthétiques et naturels ont été proposés comme alternative à l’alginate pour la formation de systèmes pour l’implantation: le poly-glycolic acid (PGA), le poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA), le polyacrylate... [67]. Le polyéthylène glycol (PEG) [69] a été testé mais demande une étape de photopolymérisation qui est potentiellement toxique. L’agarose [70], le chitosan [48], le collagène [71] et du silice [72] sont également testés. Ces nouveaux matériaux ne semblent pas, pour l’instant, des concurrents sérieux à l’alginate, car aucun apport majeur de propriétés par rapport aux capsules d’alginate n’a été remarqué [21].

Pour la microencapsulation, ce sont plutôt des associations de plusieurs polymères (dont un en général est de l’alginate) qui sont testées ; des mélanges d’agarose et d’alginate dans des proportions différentes permet d’obtenir des capsules avec une meilleure sphéricité [73], une association de cellulose-alginate [74] donne des gels avec des porosités différentes selon leur proportion, l’association alginate-chitosan donne des gels plus stables [75] ou encore le greffage de PEG sur des capsules de collagène améliore la biocompatibilité [76].

## 1.2.2 L’encapsulation multicouche

Afin d’améliorer les performances mécaniques et de diminuer la porosité des capsules obtenues par une encapsulation monocouche, une encapsulation dite multicouche a été proposée. Il s’agit d’ajouter à la première couche d’alginate une couche de polyélectrolytes de charge opposée, le plus souvent de la polylysine (notée PLL), pour rigidifier la structure [18].

## I.2.2.1. UTILISATION DE LA POLYLYSINE (PLL)

Le PLL est le polyélectrolyte historiquement utilisé par Lim et Sun [18] et reste celui étudié dans la grande majorité des études. Le PLL est fortement immunogène par sa charge positive [77][78], la couche de polyélectrolyte est donc recouverte d’une couche d’alginate afin de limiter ce phénomène. Ces capsules sont donc constituées de trois couches successives : alginate-polylysine-alginate notées capsules APA.

Le procédé de fabrication comporte trois étapes réalisées dans des bains successifs (Figure 10): la gélification dans un bain gélifiant, une première couche dans un bain de polycations (en général de 0,01% à 0,05% w/w), puis un dernier bain pour la seconde couche d’alginate moins concentrée (dilution par 10 comparé au cœur de la capsule)[53][57]. Initialement, une quatrième étape était ajoutée pour rendre le cœur de la capsule liquide en dissolvant l’alginate par du citrate, mais les capsules obtenues avaient des propriétés mécaniques faibles [57].

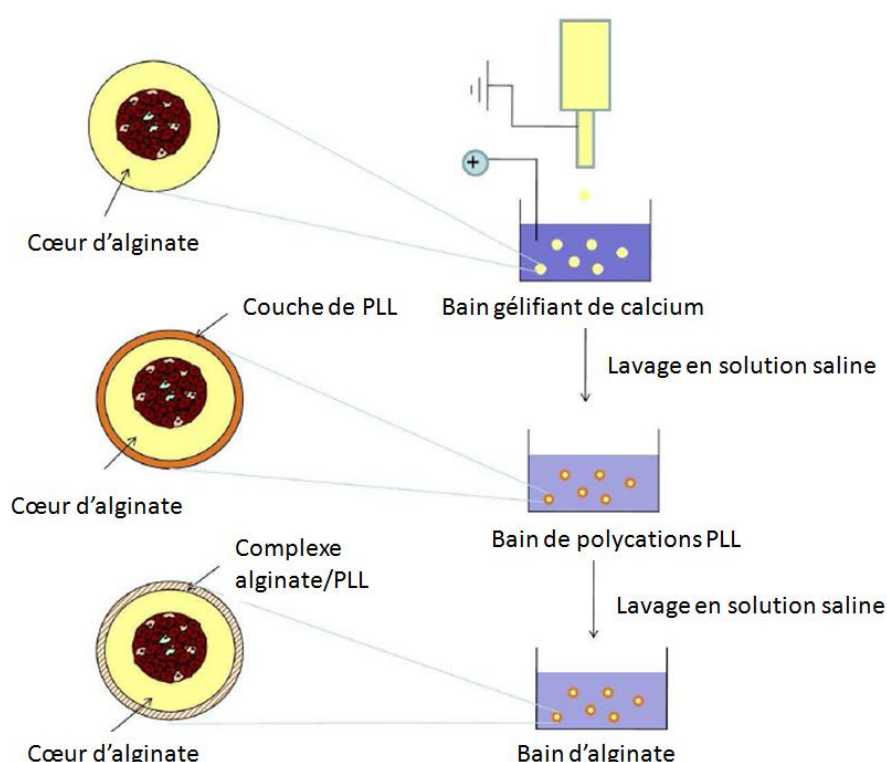


Figure 10 – Procédé de fabrication de capsule multicouche APA : premier bain de gélification des capsules formant le cœur de la capsule, deuxième bain pour effectuer la couche de polycations et dernier bain d’alginate afin de recouvrir la couche de polycations [79].

## I.2.2.2. AUTRES POLYCATIONS TESTES

Des essais ont été réalisés avec de multiples polycations [80]. La poly-D-lysine [81], le PLO (Poly-L-Ornithine)[82], le PMCG Poly(méthylène-co-guanidine) [83] ou encore le N-vinylpyrrolidone (NVP) [84] peuvent être cités. L’équipe de d’Igor Lacik [85][86] utilise des capsules avec trois associations différentes : le cœur en alginate de sodium, le polyanion en cellulose sulfate et le polycation en Polyméthylène-co-guanidine. Selon certaines études, ces nouvelles couches permettent d’augmenter la résistance mécanique et de diminuer la porosité des capsules. Selon d’autres, les résultats sont plus contrastés [81]. La biocompatibilité de ces couches est encore sous questionnement, du fait d’une forte adhésion de protéines à la surface et d’une réaction immunitaire

[87]. Le PLO semble être cependant un polyélectrolyte prometteur puisque des premiers tests cliniques menés sur deux patients par l’équipe de Calafiore [88] ont montré de bons résultats sans aucun effet secondaire observé à ce jour.

Les compositions possibles pour les capsules sont illimitées et font l’objet de très nombreuses investigations. Cependant, certaines équipes ne sont pas convaincues de l’avantage d’une telle encapsulation car ils estiment que les résultats d’implantation des capsules monocouches avec la présence de baryum dans la solution gélifiante sont plus satisfaisants [89][42].

### 1.2.3 La réaction immunitaire des différentes encapsulations

---

L’influence de la composition de l’alginate (rapport G/M) sur la biocompatibilité des capsules a fait l’état de nombreuses investigations mais reste encore controversée. Il a été démontré que la forte présence d’acide mannuronique M entraîne une forte réaction immunitaire et la formation de fibroses [90]. Au contraire, Clayton *et al.* [91] et De vos *et al.* [92] montrent sur des capsules APA, que le développement de fibroses a lieu pour des capsules réalisées avec un alginate avec un fort taux de G.

La biocompatibilité de l’encapsulation multicouche pose question car même avec une couche supplémentaire d’alginate, une réaction inflammatoire (fibrose, présence de cytokines...) apparaît fréquemment [93][94]. Cette réaction inflammatoire est fonction croissante de la concentration en PLL [95] qui est donc bien responsable de cette réaction inflammatoire. La spectroscopie XPS a permis de montrer que malgré la seconde couche d’alginate, le PLL était encore présent en surface de la capsule [96][97], ce qui explique les réponses immunitaires fortes dans la plupart des expériences réalisées. La qualité du recouvrement de la dernière couche d’alginate dépend du nombre de liaisons entre PLL et l’alginate et de sa stabilité. La composition de l’alginate (rapport G/M) joue encore une fois un rôle déterminant car il a été montré que plus le pourcentage de M est élevé et plus la liaison de PLL est forte. Le PLL a une plus forte affinité pour le monomère M que pour le monomère G [53][57]. De Vos [92] explique donc la réaction observée sur les capsules APA réalisées avec un fort taux de G par une mauvaise liaison avec le PLL.

Cependant, les résultats sont unanimes sur le fait que la réaction inflammatoire dépend en majorité du degré de pureté de l’alginate utilisé [98][99]. Le degré de pureté est défini principalement par la quantité d’endoxines, de polyphénols (qui doit être inférieure à 350EU par patient) et la quantité d’ions métalliques présente. Les techniques d’obtention d’alginate purifié sont loin d’être faciles et sont très longues [100]. Actuellement des alginates purifiés réalisés par des protocoles standardisés sont disponibles sur le marché. L’importance de cette purification sur la réaction immunitaire a été montrée par De Vos. *et al* [101] sur des microcapsules APA vides implantées chez le rat. Les capsules fabriquées avec de l’alginate purifié ont montré une diminution de 10% de la formation de fibroses. Puis l’équipe de Langlois, a montré que la purification de l’alginate jouait également sur la viabilité des cellules encapsulées [102]. Ainsi, un alginate purifié limite la réaction du système immunitaire et augmente significativement la viabilité des îlots encapsulés.

### 1.2.4 Techniques de caractérisation des capsules

---

La caractérisation des capsules est une étape nécessaire pour comprendre les expériences d’implantation. Comme nous l’avons vu, la composition, la résistance mécanique, la porosité et la rugosité de surface sont autant d’éléments clés qui déterminent la biocompatibilité finale des



capsules. Il s’agit donc de trouver des moyens de les caractériser de façon précise et standardisé [47]. Dans ce paragraphe, les différents outils de caractérisation des capsules sont décrits.

### I.2.4.1. CARACTERISATION DU PROCEDE DE FABRICATION DE CAPSULES

La répartition (homogène ou inhomogène) de l’alginate dans la capsule détermine ses futures caractéristiques. Pour déterminer cette répartition, la principale méthode utilise la microscopie confocale et le marquage par fluorescence du calcium par fluo 3 [103] (Figure 11) ou de l’alginate avec la fluoresceinamine [62]. Le PLL peut être également marqué par un kit de protéines Alexa 546 [66].

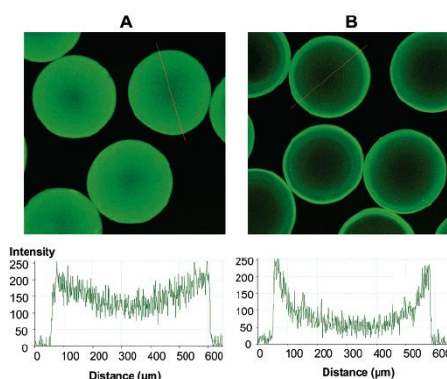


Figure 11 – Répartition de l’alginate dans les capsules a) Gélification dans un bain à 50 mM de  $\text{CaCl}_2$ , b) Gélification dans un bain de 10 mM  $\text{CaCl}_2$  d’après Morch, une faible concentration de calcium favorise la production de capsules inhomogènes.

### I.2.4.2. RESISTANCE MECANIQUE

La résistance mécanique de la structure doit être assez importante pour éviter l’éclatement, ce qui mettrait les îlots à découvert et enclencherait des réactions immunitaires. Cette résistance mécanique dépend du site d’implantation choisi [104] et des cellules encapsulées [105]. Pour une implantation dans la cavité péritonéale, Lacik [55] considère que les capsules doivent pouvoir résister à des forces de plus de 10 grammes/capsule.

Il existe actuellement différentes méthodes pour réaliser cette caractérisation :

- Exposition à des solutions salines plus ou moins concentrées en calcium et en sodium pour tester la résistance au gonflement osmotique (cf. I.2.1.3.1).
- Exposition à une force mécanique pour déterminer notamment le module d’Young du matériau.

#### I.2.4.2.1. Stress osmotique

Le phénomène de gonflement osmotique a été présenté au paragraphe 3.1.3. Pour évaluer le gonflement osmotique, les capsules sont exposées à des solutions de concentrations différentes en calcium ou en ions chélateurs : par exemple, dans de l’eau [82], du citrate [83] ou encore dans du sérum [81]. Le gonflement osmotique de la capsule est alors mesuré en pourcentage de grossissement par rapport à la taille initiale de la capsule. Ces mesures ne permettent pas l’obtention du module d’Young du matériau mais ont l’avantage d’être facilement accessibles pour tous laboratoires et peuvent être standardisées [47].



## 1.2.4.2.2. Exposition à une force d’appui et calcul du module d’Young

Plusieurs outils existent pour obtenir des informations sur la résistance mécanique des capsules (module d’Young, propriétés viscoélastiques...).

La plupart des études répertoriées sont réalisées à l’aide d’un texturomètre. La capsule est placée sous une sonde qui descend avec une vitesse connue et écrase la capsule jusqu’à sa rupture. La courbe de la force exercée en fonction du pourcentage de déformation de la capsule est tracée et donne des informations sur les propriétés élastiques du matériau [61][106][107] (Figure 12-a). Pour déterminer le module d’Young, la formule d’Hertz, majoritairement utilisée, considère les vingt premiers pourcents de déformation (Figure 12-b). Pour de plus grandes déformations (jusqu’à 60 %), c’est le modèle de Takara qui doit être utilisé [108]. L’inconvénient de cette méthode est qu’il est difficile de faire la mesure sur une seule bille de petite dimension ( $\leq 500 \mu\text{m}$ ) car cela requiert une sensibilité importante. D’autres dispositifs sont alors développés pour mesurer directement la résistance mécanique sur de plus petites dimensions ( $\leq 500 \mu\text{m}$ ), comme les dispositifs à MEMS [109] ou l’utilisation de l’AFM [110] qui permet de faire une mesure à un endroit précis. Le module trouvé par ces méthodes pour les billes d’alginate est compris entre 100 kPa et 1000 kPa selon le procédé de fabrication utilisé.

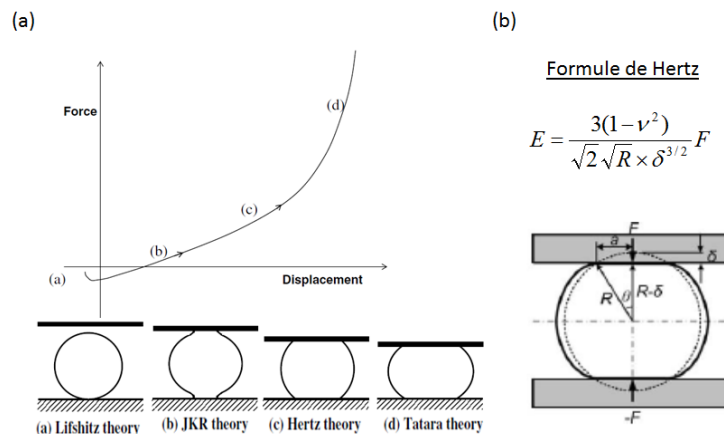


Figure 12 – Test de compression sur des billes, a) Théorie en fonction du pourcentage d’écrasement de la bille [108], b) Formule de Hertz pour les déformations inférieures à 20%. Pour les billes, le coefficient de Poisson  $\nu$  est égal à 0,5 [109] [110] ou 0,3 [106] [107].

Pour obtenir des informations supplémentaires sur les propriétés viscoélastiques du gel, comme les modules élastiques  $G'$  et visqueux  $G''$ , des tests dynamiques sous oscillations peuvent être menés [111][59].

Le problème est que ces mesures sont sensibles à des multiples paramètres : les conditions de mesure (la vitesse d’écrasement, mesure dans l’eau ou à l’air libre) ainsi que des paramètres de la capsule (pourcentage d’alginate, composition d’alginate, ion gélifiant...). Chaque groupe a ses propres techniques de fabrication et protocoles de caractérisation, ainsi, il est difficile de trouver des points de comparaison.

## 1.2.4.3. POROSITE

Comme énoncé précédemment la porosité est un paramètre clé pour la biocompatibilité des capsules. En effet, la taille des pores doit être contrôlée précisément afin de laisser passer les

## Chapitre I – Etat de l’art

nutriments, l’oxygène et l’insuline mais être une barrière efficace contre les cellules du système immunitaire, les anticorps et les cytokines.

Le tableau Figure 13 regroupe les tailles des différentes molécules auxquelles la capsule doit être perméable ou non :

<i>Capsules imperméables</i>	<i>Capsules perméables</i>
Immunoglobulines (IgG) : MW >150 kDa	Insuline : MW $\approx$ 5700 Da
Compléments : MW > 200 kDa	Glucagon : MW $\approx$ 3485 Da
Cytokines ▼ toxiques pour les cellules pancréatiques: IL-1 $\beta$ ("Interleukin-1 $\beta$ ") : MW $\approx$ 17500 Da TNF- $\alpha$ ("Tumor Necrosis Factor $\alpha$ ») : MW $\approx$ 51000 Da	Glucose : MW $\approx$ 180 Da

Figure 13 – Poids des différentes molécules impliquées lors d’une transplantation (d’après S. Le Vot [79])

Le gap entre les cytokines et l’insuline est très fin et il est difficile de contrôler la porosité à ce point. Calafiore recommande une perméabilité de 50 à 70 kDa, empêchant ainsi les immunoglobulines (~150 kDa) et une partie des cytokines d’entrer [112].

La porosité des capsules est déterminée en cherchant la taille minimale du soluté pouvant entrer dans la capsule (MWCO pour Molecular weight cut off).

Cela peut être fait principalement de deux manières :

- Techniques spectroscopiques : marquage des molécules, notamment d’IgG molécule d’intérêt dans le cas d’une greffe [113].
- Chromatographie à exclusion stérique inverse [114]. Cette technique utilise des molécules dextran de tailles standards pour déterminer la porosité et la distribution des pores d’une capsule. En revanche, cette technique ne permet pas de considérer les interactions chimiques entre molécules du système immunitaire et la capsule.

L’imagerie de la surface peut également donner une information sur la porosité. A considérer avec précaution, car cela ne prend absolument pas en compte les interactions stériques et encore moins chimiques. La microscopie électronique balayage est utilisée sur des capsules séchées par lyophilisation [115][116], cryo-préparation [60] ou en flux supercritique[117][118] pour observer la structure et la porosité du gel.

#### I.2.4.4. ANALYSE DE SURFACE

La rugosité des microcapsules est également un paramètre clé à contrôler, car il a été montré que des capsules avec une forte rugosité induisent une forte réaction [2]. La rugosité est principalement analysée par AFM [63][110][119].

La composition chimique présente à la surface de la capsule est analysée par XPS (spectroscopie à rayons X) [96][120][97]. Ces techniques ont notamment été utilisées pour visualiser la surface de capsules APA. Il a été ainsi observé que la couche de PLL n’était pas totalement recouverte par l’alginate expliquant peut être en partie la réaction immunitaire enclenchée par ces capsules [97].

### I.2.4.5. BIOCOMPATIBILITE

La biocompatibilité des capsules peut être évaluée *in vitro* et *in vivo*. Les principales analyses effectuées sont :

- Pour les tests *In vitro* : la viabilité et la fonctionnalité (dosage des sécrétions) des cellules encapsulées (Test de viabilité, MTT, Elisa...)
- Pour les tests *In vivo* : l’analyse de la réponse immunitaire et de l’inflammation des tissus après implantation (PCR sur les ARNm des cytokines, analyse histologique...), la quantification de la prolifération cellulaire (fibrose) autour de la capsule (réalisée par analyse d’images, histologie...), l’analyse de l’état des capsules retirées après implantation (nombre de capsules flottantes...).

Pour plus d’informations, nous renvoyons le lecteur à la revue de De Vos qui décrit en détails ces analyses ainsi que les références associées [47].

### I.2.5 Les essais *in vivo* chez le gros animal

---

Après la première transplantation réalisée par Lim et Sun en 1980 [18], les essais sur le rongeur se sont multipliés. Pour aller plus loin, certaines études ont pu être menées sur de plus gros modèles animaux comme le chien, le cochon ou le singe et de premiers essais cliniques ont été réalisés sur des humains.

Les équipes de Soon [121], Shiong et Wang [86] reportent des allotransplantations<sup>9</sup> chez des chiens. La première étude reporte un rétablissement pendant 172 jours sans besoin d’insuline et une détection de C-peptide<sup>10</sup> jusqu’à 726 jours après implantation. La seconde étude reporte un maintien d’un bon niveau en insuline jusqu’à 214 jours après implantation.

Sun [122] puis Elliot [123], utilisent respectivement des capsules d’alginate-polylysine-alginate et d’alginate-polyornithine-alginate pour réaliser des xéno-transplantations du cochon chez le singe. L’étude de Sun sur 9 singes révèle, une insulino indépendance variable durant 120 jours à 804 jours. Après retrait, les capsules ne présentent pas de fibrose. L’étude d’Elliot est moins positive puisque l’administration d’insuline, même si moindre que pour le groupe témoin, est toujours nécessaire après deux transplantations.

Enfin, quelques essais cliniques ont été réalisés. Nous pouvons citer les études de Calafiore [88] avec des capsules d’alginate-polyornithine-alginate (capsules de 500 µm avec une concentration d’alginate de 1,6% réalisées par technique à flux d’air coaxial cf. I.3.1.1) et Tuch [124] avec des capsules monocouche de baryum (diamètre moyen de 340 µm, variant entre 255-750 µm). L’étude de Calafiore réalisée sur deux patients montre une diminution de la glycémie et la détection du peptide C après implantation pendant 1 à 2 ans. L’étude de Tuch note sur quatre patients une diminution des besoins en insuline et la détection du peptide C pendant 2,5 ans. Cependant, après extraction des capsules, elles sont recouvertes de fibrose et la plupart des îlots sont nécrosés.

Cette liste d’essais est non exhaustive, mais nous pouvons remarquer le manque de reproductibilité tant sur l’effet de la transplantation sur l’hôte (taux de glucose, besoin d’insuline exogène...) que sur

---

<sup>9</sup>Transplantation de cellules d’un individu dans lui-même.

<sup>10</sup>Molécule de liaison de l’insuline, utilisée comme marqueur de la sécrétion d’insuline

la réponse du système immunitaire (apparition de fibrose reportée que dans certains essais). Ce manque de reproductibilité est notamment dû à des compositions de capsules et des protocoles de fabrication non standardisés, mais pas seulement. En effet, l’équipe de J. Oberholzer souligne le problème de la pertinence des modèles animaux [125]. La réponse immunitaire à l’implantation de capsules est spécifique selon les espèces, par exemple, des capsules de baryum implantées chez la souris ou chez le singe n’induisent pas la même réponse immunitaire [68].

### I.3 LES TECHNIQUES DE MICROENCAPSULATION

Jusqu’à présent, nous avons présenté l’influence de la composition de l’alginate et du procédé de gélification du polymère sur la biocompatibilité des capsules. La technique utilisée pour la production des capsules va également jouer sur d’autres paramètres déterminants pour la biocompatibilité.

En effet, la technique définit la taille des capsules ainsi que leur monodispersité et leur sphéricité. De plus, suivant la technique, la viscosité utilisable peut être plus ou moins limitée. Or, ce paramètre influence la résistance mécanique et la porosité des capsules. D’autre part, un autre critère entre en jeu, le débit de production. Ce débit doit permettre l’encapsulation d’un nombre d’îlots suffisant à une implantation en un minimum de temps. Rappelons que la quantité d’îlots nécessaire est de l’ordre de 11 000 IEQ/kg [11].

Parmi les différentes techniques de microencapsulation, nous distinguons deux grandes familles que nous allons détailler l’une après l’autre : les techniques macroscopiques et les techniques microfluidiques microscopiques.

Globalement, la microencapsulation se déroule suivant trois étapes : répartition homogène des cellules dans la solution de polymère, production de gouttes de la suspension alginate/cellules, gélification des gouttes pour former les capsules. Des étapes supplémentaires sont ajoutées pour une encapsulation multicouche. La première étape est commune aux deux familles de systèmes, la différence se trouve dans les deux étapes suivantes, la production de gouttes et la gélification.

#### I.3.1 Systèmes macroscopiques

---

Il existe plusieurs types de systèmes macroscopiques regroupés sous le nom de méthode de « dripping ». Le principe commun consiste en la formation d’une goutte d’alginate au bout d’une aiguille qui se détache et tombe dans un bain gélifiant. La majorité des systèmes présente une instrumentation pour forcer la goutte à se détacher avant qu’elle n’atteigne sa taille finale afin d’obtenir des gouttes de taille plus petite et contrôlée. Les différents systèmes sont à flux d’air coaxial, à potentiel électrostatique, à vibrations ou à jet cutter (Tableau - Figure 14).

##### I.3.1.1. PRESENTATION DES DIFFERENTES TECHNOLOGIES EXISTANTES

Les technologies macroscopiques sont comparées dans le tableau Figure 14 selon différents critères : les tailles des capsules formées, leur sphéricité, la viscosité utilisée et le débit de production. Cette étude s’appuie sur la revue de Prüsse [126] et l’étude bibliographique menée par S. Le Vot [79].

## Chapitre I – Etat de l'art

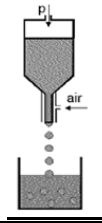
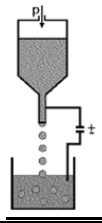
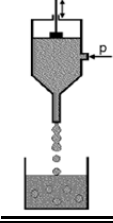
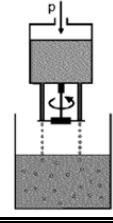
	<b><u>Flux d'air coaxial</u></b> [127][128]	<b><u>Potentiel électrostatique</u></b> [129][130]	<b><u>Vibration</u></b> [131]	<b><u>Jet cutter(mode normal)</u></b> [132]
				
<b><u>Principe</u></b>	Le jet d'air coaxial au flux d'alginate permet de détacher la goutte avant qu'elle n'atteigne sa taille définitive.	La suspension d'alginate est chargée d'une tension statique et l'électrode de polarité opposée est attachée à la cuve de collection. La différence de potentiel attire la gouttelette vers le bas.	La suspension s'écoule dans une aiguille, un système de vibration permet de détacher la goutte avant qu'elle n'atteigne sa taille définitive.	La suspension s'écoule d'une aiguille en un jet coupé par un fil ou un disque en rotation.
<b><u>Taille</u></b>	Moyenne : 600-800 $\mu\text{m}$ Taille minimale : 500 $\mu\text{m}$  Billes homogènes en taille.	Moyenne : 400-800 $\mu\text{m}$ Taille minimale : 100-200 $\mu\text{m}$  Capsules monodisperses : technique reproductible	Moyenne : 500 $\mu\text{m}$ à 1 mm Taille minimale : 100 $\mu\text{m}$ (si vibrations couplées à une différence de potentiel)  Limitation : le diamètre minimal des gouttes est au moins 1,5 fois supérieur au diamètre de l'aiguille	Moyenne : 300 $\mu\text{m}$ à 1,5 mm Minimale : 100 $\mu\text{m}$  A faible viscosité (inférieure à 150 mPa.s), les gouttes produites sont peu homogènes en taille. Au-delà de cette limite basse en viscosité, les capsules sont monodisperses.
<b><u>Sphéricité</u></b>	Capsules sphériques pour une viscosité à faible cisaillement inférieure à 5 Pa.s. Au-delà, perte de la sphéricité.	Capsules sphériques	Billes sphériques uniquement dans la gamme de viscosités indiquée.	Faible viscosité (inférieure à 100-150 mPa.s) : gouttes peu sphériques. Très forte viscosité (vers 10 Pa) : les capsules tendent vers une forme ovale. Pour des concentrations intermédiaires, les capsules sont sphériques.
<b><u>Viscosité</u></b>	Pas de limitation en viscosité	Pas de limitation	Très forte limitation en termes de viscosité : des gouttes sphériques ne sont produites que dans la gamme 100-500 mPa.s. Au-delà de 500 mPa.s, aucune goutte ne peut être produite	Pas de capsule produite avec des solutions de viscosité inférieure à 50 mPa.s. Fonctionnement optimal pour une viscosité supérieure à 200 mPa.s.
<b><u>Productivité</u></b>	30 ml/h en moyenne pour une aiguille.  Fréquence de plus en plus limitée en augmentant la viscosité des solutions	30 ml/h en moyenne pour une aiguille  Fréquence de plus en plus limitée en augmentant la viscosité des solutions	Fort débit de production : jusqu'à 650 ml/h pour une aiguille. Le débit de production est de 20 à 40 fois supérieur à celui des techniques à flux d'air coaxial ou à différence de potentiel.	Débit de production des capsules 200 à 500 fois plus élevé qu'avec les technologies de flux d'air coaxial ou de différence de potentiel. La différence est encore plus marquée à forte viscosité.

Figure 14 – Tableau comparatif des différentes technologies macroscopiques pour la production contrôlée de gouttes microscopiques [126].

Le point fort de ces méthodes est le débit de production : plus de 30 ml/h (~2 000 gouttes/min pour une capsule de 800  $\mu\text{m}$  de diamètre) pour toutes les méthodes présentées, avec un débit dépassant le litre par heure pour les techniques avec jet cutter et avec vibrations.

Cependant, l’ensemble des techniques présente des limitations importantes pour l’encapsulation de cellules et d’îlots de Langerhans :

- La taille moyenne des capsules est de l’ordre de 400  $\mu\text{m}$ -800  $\mu\text{m}$ , ce qui n’est pas adapté à l’ensemble des tailles des îlots (compris entre 50  $\mu\text{m}$  et 400  $\mu\text{m}$ ). Des tailles plus petites peuvent être obtenues mais cela demande un compromis : en diminuant la taille, la polydispersité augmente.
- La viscosité utilisée est limitée surtout pour les méthodes de vibrations et l’utilisation de viscosité élevée influence négativement la sphéricité et/ou la taille des capsules pour les autres techniques.
- Les gouttes formées tombent dans un bain gélifiant. A cause de l’impact, les formes obtenues ne sont pas toujours sphériques. Aussi, des bulles d’air peuvent être créées au cours de l’impact et rester encapsulées [133]. Plus grave, l’îlot se déplace pendant l’impact à la périphérie de la capsule, qui gélifie en l’état, avec un risque de protrusion élevé (Figure 15).

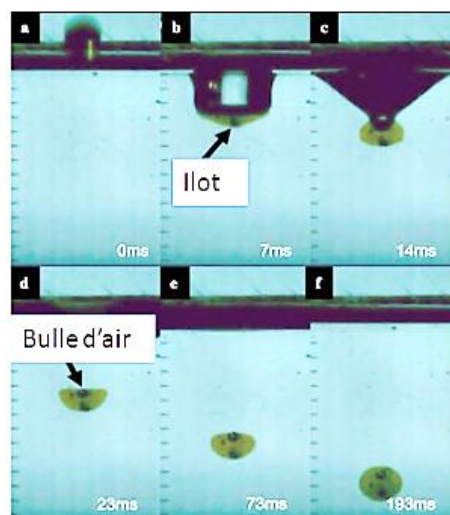


Figure 15 – Impact d’une goutte d’alginate dans un bain gélifiant et déplacement de l’îlot à la périphérie de la capsule formée [133].

Le désavantage majeur de ces techniques est qu’il est difficile de produire, avec alginate à forte viscosité, des capsules qui soient à la fois de petites tailles et monodisperses. Le potentiel électrostatique semble cependant la méthode pour laquelle il y a le moins de contraintes.

Plusieurs entreprises commercialisent actuellement de tels systèmes : Nisco [134] , Buchi [135]....Cependant, ces systèmes coûtent chers pour de petits laboratoires car ils sont plutôt destinés à une production industrielle. Cependant, des systèmes alternatifs à moindre coût et performants commencent à apparaître [136].

### I.3.1.2. PRINCIPALES AVANCEES ET NOUVELLES OPTIMISATIONS DES SYSTEMES MACROSCOPIQUES

De nouvelles optimisations ont été apportées sur ces systèmes pour combler les principaux défauts cités précédemment.

Plusieurs optimisations concernent l’obtention de capsules avec une meilleure sphéricité :

- Chan [137] a étudié comment optimiser les paramètres du système (diamètre de l’aiguille, distance de collecte..) et du matériau (viscosité, densité, tension interfaciale...) pour garantir la forme sphérique des capsules produites.
- Zimmermann [63] utilise un système de dripping modifié. La gélification en bain externe est précédée par une injection de nano cristaux de  $\text{BaSO}_4$ . Ces cristaux rigidifient les gouttes avant qu’elles ne tombent dans la solution aqueuse. De ce fait, les capsules obtenues ont une meilleure sphéricité (Figure 16). Un système plus abouti avec la préparation automatisée de la solution de cellules avec l’alginate a ensuite suivi [138].

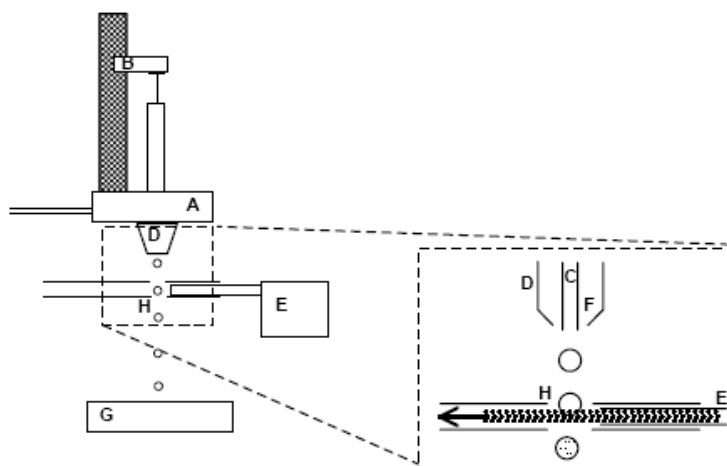


Figure 16 – Représentation schématisée du pistolet à cristaux [63] (A) Génération de gouttes, (B) Moteur électrique, (C) Canal intérieur, (D) Formation de la goutte, (E) Jet de cristaux de  $\text{BaSO}_4$ , (F) Second canal d'air, (G) Solution gélifiante (H) Focalisation du jet de cristaux.

D'autres optimisations concernent la taille des capsules. Des systèmes issus des technologies à jet d'encre commencent à apparaître. Une impulsion thermique, acoustique ou piézo-électrique crée la goutte qui tombe dans un bain gélifiant [139][140]. Les capsules formées peuvent être très petites, de l'ordre de  $10\mu\text{m}$ , avec une bonne uniformité. Le principal désavantage est le fonctionnement à basse viscosité, limitée à une centaine de  $\text{mPa.s}$  [141].

Concernant la viscosité, de récentes études utilisent des techniques assistées par laser, qui permettent de former des gouttes d'alginate avec une concentration de 6% (w/v) (viscosité de  $2600\text{ mPa.s}$ ). Pour le moment la sphéricité et la monodispersité ne sont pas acquises et les capsules ont une forme de larme [142], mais la taille descend tout de même à  $150\mu\text{m}$ .

Enfin, même si la fréquence de production est déjà satisfaisante, de nouveaux systèmes permettent encore d'améliorer la productivité. Le système de Tendulkar [143] fonctionne sur le principe de la technologie coaxiale mais possède 8 sorties, permettant une production de 144 capsules/s avec des tailles comprises entre  $500\mu\text{m}$  et  $700\mu\text{m}$ . La démonstration est réalisée sur des îlots de Langerhans humains.

D'autre part, une autre notion commence à faire son apparition : c'est la notion de reproductibilité et d'automatisation des procédés d'encapsulation. Entre la première goutte et la dernière goutte, le temps de gélification n'est pas le même. Ensuite, l'ensemble des procédés de lavages et des procédés pour l'encapsulation multicouche sont manuels. Ce manque de reproductibilité peut être un des paramètres responsables des variations de résultats sur les essais précliniques et cliniques d'implantation de capsules.



Quelques travaux prennent actuellement en compte ce problème. Les travaux de l’équipe de Lacik [144] visent à automatiser le dépôt de la couche de polyelectrolyte de façon à bien contrôler le temps de contact entre l’alginate et PLL et à former des capsules les plus uniformes possibles. Récemment, un système à trois flux concentriques basé sur la technique à potentiel électrostatique permet la fabrication de capsules d’alginate recouvertes d’une couche de polysaccharide (polyethersulfone) en une seule étape [145].

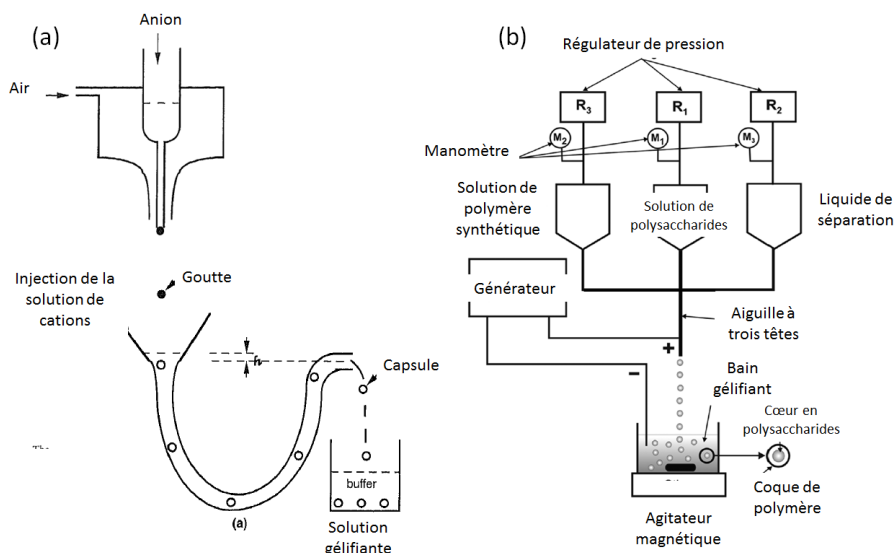


Figure 17 – Automatisation des procédés de production de gouttes en macrosystème a) Système de Lacik [144], b) Système de Lewinska [145]

### 1.3.2 Systèmes microfluidiques

#### 1.3.2.1. LA MICROFLUIDIQUE ET SES APPLICATIONS

Patrick Tabeling [146] définit la microfluidique comme la discipline portant sur les écoulements de fluides simples ou complexes, mono ou multiphasiques, dans des microsystèmes artificiels, c'est-à-dire fabriqués à l'aide des nouvelles techniques ». Tabeling précise que le terme « nouvelle technique » désigne les techniques de microfabrication héritées de la microélectronique.

L'utilisation des systèmes microfluidiques couvre de nombreuses thématiques. Le premier domaine d'application est celui de la biologie et de la santé. Durant ces dernières années, l'intégration de protocoles biologiques sur puce (les lab-on-chip) a fait l'objet de nombreux travaux [147][148]. Ils ont permis de mettre au point de nouveaux outils de diagnostics : analyse et séquençage d'ADN [149], immuno-assay [150], manipulation et étude des cellules [151][152][153]... Les systèmes microfluidiques commencent à s'étendre sur d'autres domaines d'applications industriels comme l'environnement, la sécurité alimentaire ou la bioproduction [154]... Même si la plupart des prototypes restent encore à l'état de recherche, la commercialisation de certains systèmes est en cours [155][156].

Depuis les années 2000, la microfluidique a commencé à trouver une nouvelle application dans la production d'émulsions contrôlées puis dans l'encapsulation. Des applications dans les domaines très variés de l'agriculture, la cosmétique et la santé semblent très prometteuses [157][158].

Parmi les applications les plus répandues, l'encapsulation de principes actifs pour la délivrance de médicaments [159] et l'encapsulation de cellules sont les deux principaux axes de développement. Concernant l'encapsulation de cellules, les projets menés concernent : l'analyse de cellules en gouttes [160][161], la culture de cellules en 3D [162][163] ou la thérapie cellulaire (cf. I.2).



Nous nous focaliserons sur les applications en thérapie cellulaire, qui est un domaine de recherche en pleine expansion. L'évolution du nombre de publications par an au cours de ces vingt dernières années, représentée Figure 18, illustre bien cette tendance. Les mots clés de la recherche menée sur gopubmed [23] sont « (microsystem\* or microfluidic\*) and encapsulation and cell\* ».

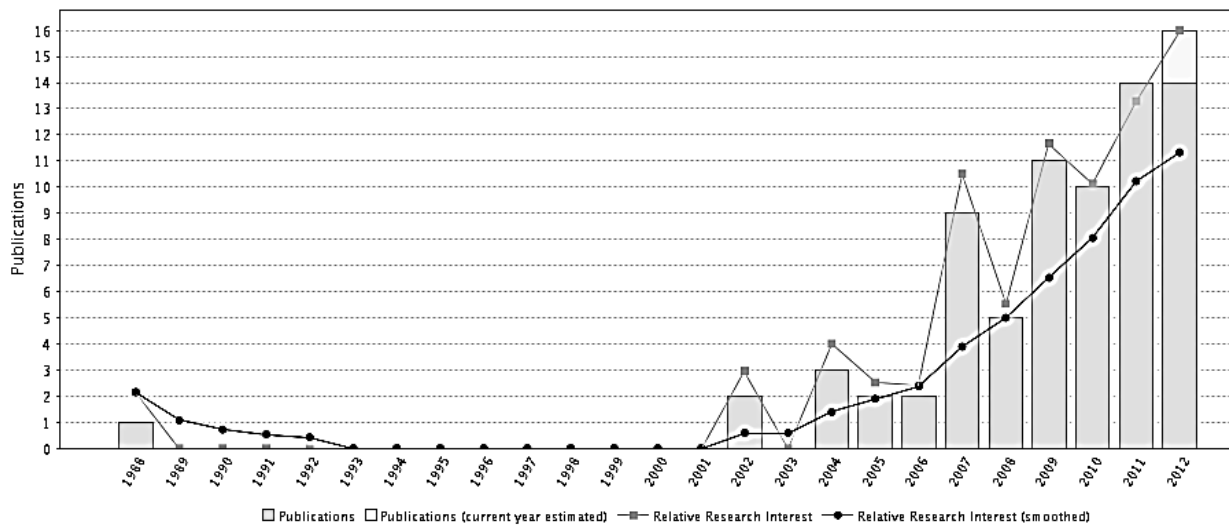


Figure 18 - Evolution des publications sur l'encapsulation de cellules par microsystèmes

La recherche bibliographique est axée sur la formation de capsules en microsystèmes fluidiques pour l'encapsulation de cellules. Comme vu avec les systèmes macroscopiques, la production de capsules requiert deux étapes critiques: la production contrôlée de gouttes et la gélification de ces gouttes. Nous ferons donc tout d'abord un état de l'art sur la production d'émulsion en microsystème puis sur les méthodes de gélification actuellement existantes. Enfin, nous montrerons, au travers de différents exemples, les fonctions supplémentaires qui peuvent être intégrées grâce à la microfluidique et leur potentiel pour l'encapsulation de cellules.

### I.3.2.2. FORMATION DE GOUTTES EN SYSTEME MICROFLUIDIQUE

Les systèmes conventionnels existants pour la formation d'émulsion (vannes d'homogénéisation à haute pression, moulin colloïdal...) [164], présents avant l'apparition de la microfluidique, forment des émulsions de tailles difficilement contrôlables et très polydisperses. C'est en ce sens que la microfluidique révolutionne les techniques de production d'émulsions.

#### I.3.2.2.1. Microfluidique digitale versus microfluidique continue

Les dispositifs actuels pour la production de gouttes monodisperses, se séparent en deux familles. On distingue la microfluidique digitale et la microfluidique en flux continu :

- La microfluidique digitale ou technologie EWOD (Electro Wetting on dielectric) (Figure 19-a) couple des effets hydrodynamiques et électriques pour déplacer des gouttes de l'ordre du nanolitre sur une surface plane. Cette surface est composée d'un réseau d'électrodes recouvert par un composant diélectrique hydrophobe. Pour actionner les gouttes, une tension électrique est établie entre la surface et une couche conductrice déposée sur le "couvercle" du dispositif. L'angle de mouillage des gouttes est fonction de la tension imposée, les gouttes sont alors déplacées par actionnement successif des électrodes selon le schéma Figure 19-b.

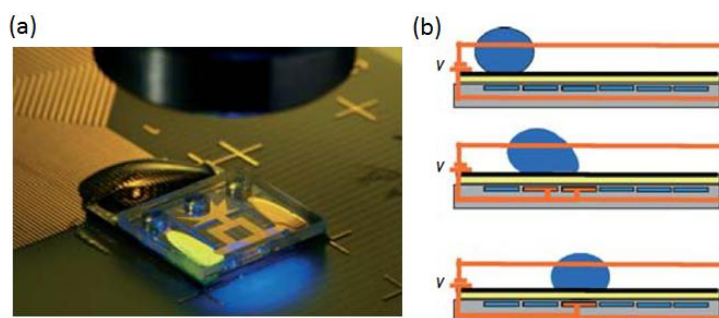


Figure 19 – Technologie EWOD [165] a) Puce EWOD, b) Principe de fonctionnement : déplacement des gouttes.

Cette technique est principalement utilisée en santé pour l’analyse de gouttes [166][167][168], mais la formation de capsules en polymère via cette méthode n’est pas référencée. De plus, les essais effectués lors de la thèse de S. Le Vot se sont révélés peu concluants [79].

- La microfluidique en flux continu ou microfluidique diphasique. Le principe consiste à injecter une première phase (phase dite discontinue) dans une seconde phase non miscible (phase dite continue) pour former l’émulsion. Dans le cas d’une émulsion de polymère, la phase continue est une phase organique, le plus souvent de l’huile.

L’étude bibliographique présentée porte exclusivement sur la microfluidique en flux continu, méthode la plus adaptée, dans l’optique de la production de capsules pour l’encapsulation de cellules.

### *1.3.2.2.2. Production de gouttes en flux continu: les différentes géométries de puces*

La formation de gouttes en système microfluidique est bien documentée. De multiples revues traitent des différents systèmes permettant la production de gouttes : elles présentent les différentes géométries possibles, le fonctionnement théorique ou encore les protocoles de fabrication des puces [169][170][171][172]. Nous nous sommes appuyés sur ces différents articles pour présenter les principaux systèmes permettant la formation d’une émulsion de taille contrôlée.

#### ❖ La formation d’émulsion par les membranes

Les premières méthodes microfluidiques de production d’émulsion de taille contrôlée sont apparues au cours des années 1990. Le premier dispositif recensé forme des gouttes au travers d’une membrane poreuse [173] (Figure 20-a). Une première phase est injectée dans une seconde phase non miscible au travers de la membrane (Figure 20) [174]. Le caractère hydrophile ou hydrophobe de la membrane permet de former des émulsions d’huile dans l’eau ou d’eau dans l’huile. La taille de l’émulsion et la monodispersité sont fonction de la taille des pores de la membrane et de leur uniformité [175]. L’utilisation de tensioactifs aide à limiter les coalescences qui augmentent la polydispersité finale de l’émulsion.

L’émulsion est simplement créée en appliquant une pression sur le fluide à disperser au travers de la membrane. Cette pression peut être accompagnée par une rotation, une vibration ou encore un pré-mixage (Figure 20-b) pour la création d’une émulsion plus fine. Les membranes les plus performantes sont actuellement les membranes appelées premix. La taille peut descendre jusqu’à  $0,1\mu\text{m}$  et le débit de production peut atteindre  $10^{18}$  gouttes par seconde. Cependant, le coefficient de dispersité de cette méthode est important de l’ordre de 10 à 20% [169].

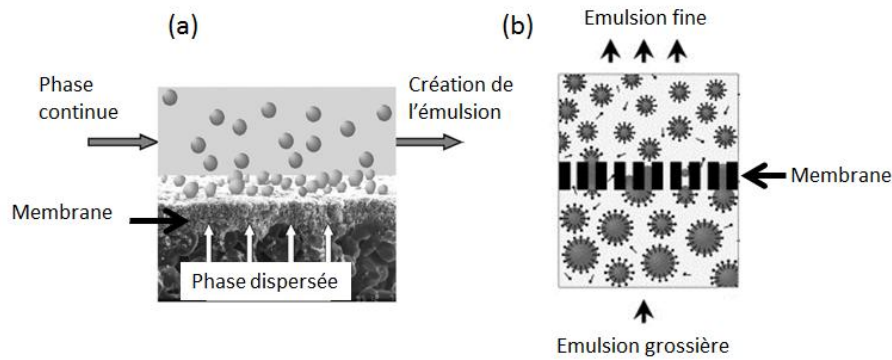


Figure 20 – Production de gouttes au travers de membrane [174], a) Principe de fonctionnement, b) Membrane premix.

### ❖ La microfluidique à géométrie plane

La microfluidique à géométrie plane se caractérise par la manipulation de fluides dans des canaux rectangulaires. Deux principales géométries sont répertoriées :

#### - Les jonctions dites en T

Cette première géométrie a été initiée par l'équipe de Thorsen [176] et présente deux canaux perpendiculaires, d'où l'appellation jonction T. La phase discontinue arrive dans un canal perpendiculaire à la phase continue. La pression dans la phase discontinue induit une elongation de cette dernière dans le canal de la phase continue. Puis la phase continue cisaille cette elongation qui se rompt en gouttes (Figure 21).

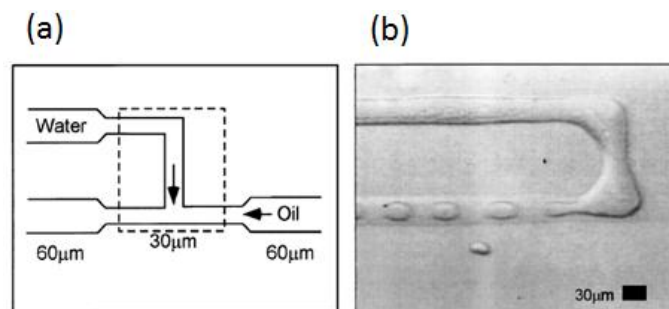


Figure 21 – Jonction T [176] a) Schéma de fonctionnement, b) Photo de la puce.

En fonction des débits des deux fluides, trois régimes de formation de gouttes sont possibles : le *squeezing*, le *dripping* et le *jetting*. La monodispersité n'est obtenue que dans les deux premiers régimes cités. Ces régimes se distinguent par des tailles de gouttes différentes. Dans le régime de *squeezing*, l'elongation de la phase dispersée remplit la zone de la jonction avant d'être cisailée par la phase continue. La taille de la goutte est donc plus grande que la taille du canal de la phase continue. Dans le régime de *dripping*, le cisaillement se fait plus tôt, la taille de la goutte obtenue est plus petite [177]. Le régime de *jetting* est obtenu pour des débits plus importants. Les gouttes sont formées plus loin que la jonction et sont polydisperses (Figure 22) [178].

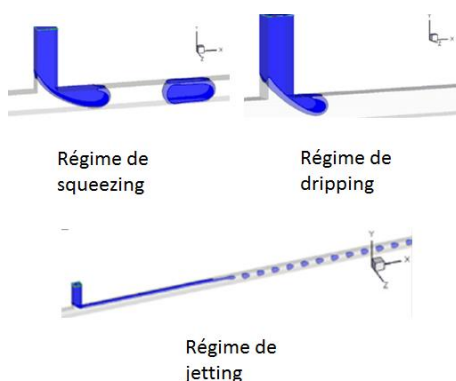


Figure 22 – Simulation des différents régimes obtenus pour une jonction T, voir l’article de Li [178].

## - Les MFFD (Micro Flow Focusing Device)

Les jonctions MFFD pour Micro Flow Focusing Device ont été proposées par l’équipe d’Anna [179]. Dans cette géométrie, les deux phases non miscibles sont forcées au travers d’une restriction géométrique (Figure 23). Le flux à disperser (exemple de l’eau) est dans le canal central et la phase continue non miscible (exemple de l’huile) se trouve dans les deux canaux extérieurs. Arrivée au niveau de l’orifice, la face continue focalise et cisaille la phase aqueuse formant ainsi l’émulsion. Une modification géométrique est proposée par Tan en 2006 [180] (Figure 23). Le canal étroit de focalisation est remplacé par une chambre triangulaire. Le fonctionnement est similaire mais d’après Tan, cette nouvelle géométrie permet une meilleure focalisation des flux au niveau de l’orifice et produit des gouttes avec une meilleure monodispersité.

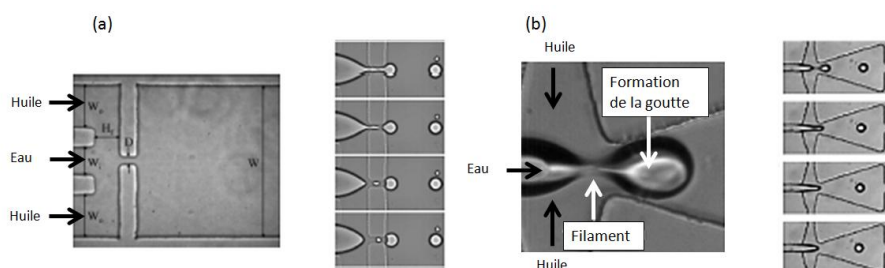


Figure 23 – Géométrie MFFD, a) Selon Anna [179], b) Selon Tan [180].

Les mêmes régimes que pour la jonction T sont observés: *squeezing*, *dripping* et *jetting* mais les explications sont plus compliquées. La taille des gouttes produites dépend du débit des flux et de leurs caractéristiques mais également des dimensions géométriques du dispositif [181].

Pour plus d’informations sur la mécanique de formation des gouttes et les différents régimes, nous renvoyons le lecteur aux travaux de Zhou [182], Garstecki [183], Xu [184] et S. Le Vot [79][185]. L’article d’Abate [186] est intéressant car il présente une étude comparative entre la formation d’émulsion par une jonction T et par un MFFD.

Afin de former des gouttes de taille plus petite, certaines équipes ajoutent à ces géométries une instrumentation supplémentaire, c’est une microfluidique active (Figure 24). Des valves ajustent la dimension de certains canaux, comme la restriction à l’endroit de la formation de la goutte (Figure 24-a) [187] ou bien la dimension du canal de sortie (Figure 24-b) [188] et permettent ainsi de faire varier la taille de l’émulsion produite. Cet ajustement se fait alors sans avoir besoin de changer les débits des flux.

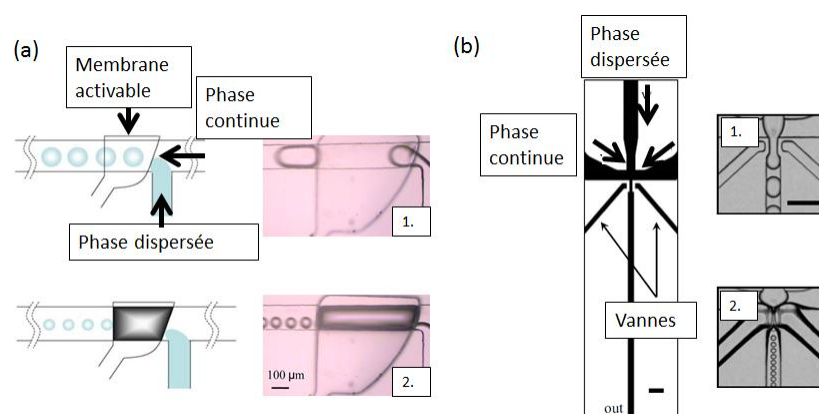


Figure 24 – Microfluidique active a) Dispositif de Wu [187], b) Dispositif de Abate [188]. La position 1) correspond à une dimension de l’orifice ou du canal de sortie large. En activant la membrane 2) les dimensions se réduisent permettant la production de gouttes plus petites sans changement des débits.

Le fonctionnement de ces dispositifs nécessite un contrôle de la mouillabilité des fluides sur la surface [189]. Pour la formation d’une émulsion de solution aqueuse dans de l’huile, la surface doit être hydrophobe. A défaut, le fluide mouille sur la surface et forme un long filament avec à son bout le détachement de gouttes polydisperses. Une émulsion dite inverse d’huile dans la solution aqueuse peut apparaître. L’utilisation de tensioactifs peut remédier à ce problème [190] ainsi que des chimies de fonctionnalisation de surface comme la silanisation [191][185].

## ❖ Microfluidique tridimensionnelle

Dans la littérature, les systèmes tridimensionnels reposent sur l’alignement d’un capillaire dans un canal fluide coaxial. Deux géométries sont possibles : les dispositifs à focalisation asymétrique simple (Figure 25-a) et les dispositifs à focalisation asymétrique à contrecourant (Figure 25-b). Dans le premier cas, la phase dispersée évolue dans le capillaire et la phase continue dans le canal suivant la même direction. Le cisaillement s’effectue au niveau de la fin du capillaire créant la formation de gouttes [192]. Pour les dispositifs à contrecourant, le principe est le même mais les deux fluides s’écoulent dans des directions opposées. Le principal avantage de la géométrie à contre-courant est que la taille des gouttes obtenues peut être très inférieure au diamètre du capillaire [193][194].

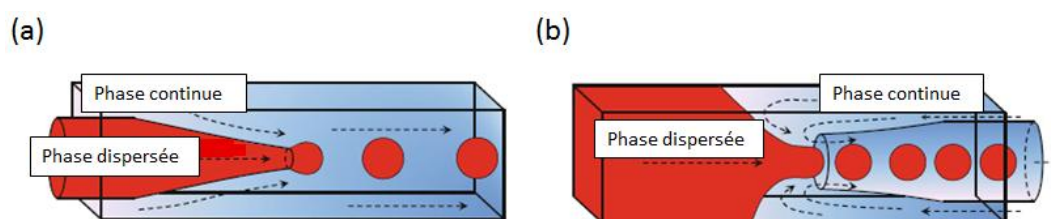


Figure 25 – Géométrie en 3D : a) Focalisation asymétrique, b) Focalisation asymétrique contrecourant.

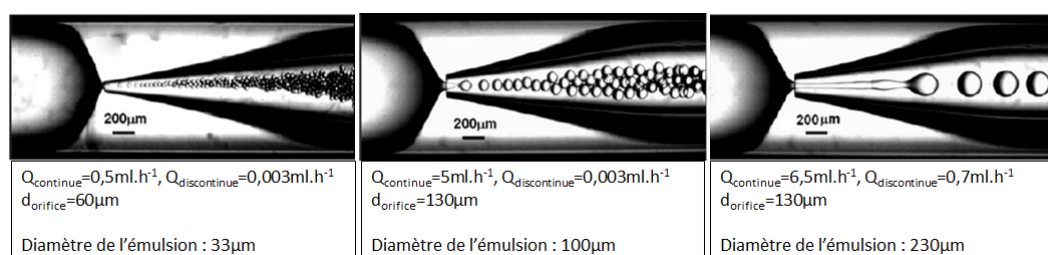


Figure 26 – Influence des paramètres fluidiques et géométriques sur la taille de l’émulsion [169].

Ces systèmes par rapport aux géométries planaires ont l’avantage que la phase dispersée ne touche jamais les parois de la puce. Il n’y a donc pas de contrainte de traitement de surface ou d’utilisation de tensioactif pour que le dispositif fonctionne.

Les dispositifs à géométrie planaire ou tridimensionnelle donnent des émulsions monodisperses (coefficient de variation du diamètre dit  $CV \leq 3\%$ ) avec une fréquence maximale de production de l’ordre de  $10^4$  gouttes par seconde pour une viscosité de la phase interne de 50 mPa.s [195]. Comparé aux émulsions créées par des membranes, la monodispersité est meilleure mais la fréquence est moindre. Cependant, cette fréquence est largement augmentée en parallélisant les dispositifs.

### 1.3.2.2.3. Emulsion multicouche

Les technologies microfluidiques permettent de former des multiémulsions, qui consistent à encapsuler des gouttes dans d’autres gouttes plus grandes. Ces multiémulsions trouvent de nombreuses applications en pharmaceutique, cosmétique, agriculture [196][197]. Par exemple lorsqu’il s’agit de protéger un principe actif puis de le libérer que sous certaines conditions de température, pH, contrainte mécanique... Shum l’utilise par exemple pour la fabrication de phospholipides [198].

Ces multiémulsions peuvent être formées suivant deux modèles :

- ❖ La mise en série de systèmes microfluidiques planaires ou tridimensionnels.

Les systèmes présentés précédemment sont alignés de façon à ce que le canal de sortie soit le canal d’entrée du système suivant. Nous citerons deux exemples, la mise en série de MFFD (Figure 27) et de dispositifs capillaires en 3D (Figure 28).

Les épaisseurs des différentes couches sont fonction des débits des différents fluides ainsi que des diamètres des différents canaux ou capillaires. Cependant, le fonctionnement nécessite que l’ensemble des systèmes soient en mode dripping et qu’il y ait une bonne synchronisation entre les différentes créations de gouttes [199].

L’utilisation de systèmes planaires en série requiert une alternance de fonctionnalisation. Pour la formation d’une émulsion aqueuse, une fonctionnalisation hydrophobe est nécessaire tandis que pour la formation d’une émulsion d’huile, une fonctionnalisation hydrophile est nécessaire (Figure 27). Le protocole nécessite plusieurs étapes de fonctionnalisation et d’exposition aux UV [199].

L’utilisation de systèmes 3D emboîtés est plus simple car aucune alternance de fonctionnalisation n’est requise [200]. En revanche, la fabrication de ces systèmes est plus compliquée car elle demande l’alignement de plusieurs capillaires avec une bonne précision (Figure 28).

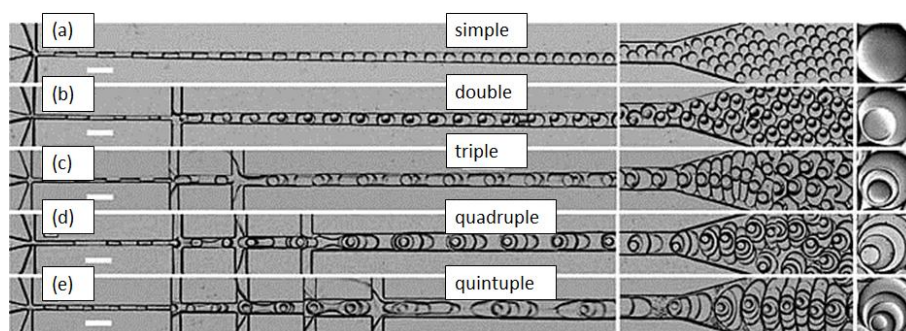


Figure 27 - Création d’émulsions multiples par des MFFD en série (a) Simple émulsion, (b) Double émulsion, (c) Triple émulsion, (d) Quadruple émulsion, (e) Quintuple émulsion [199].



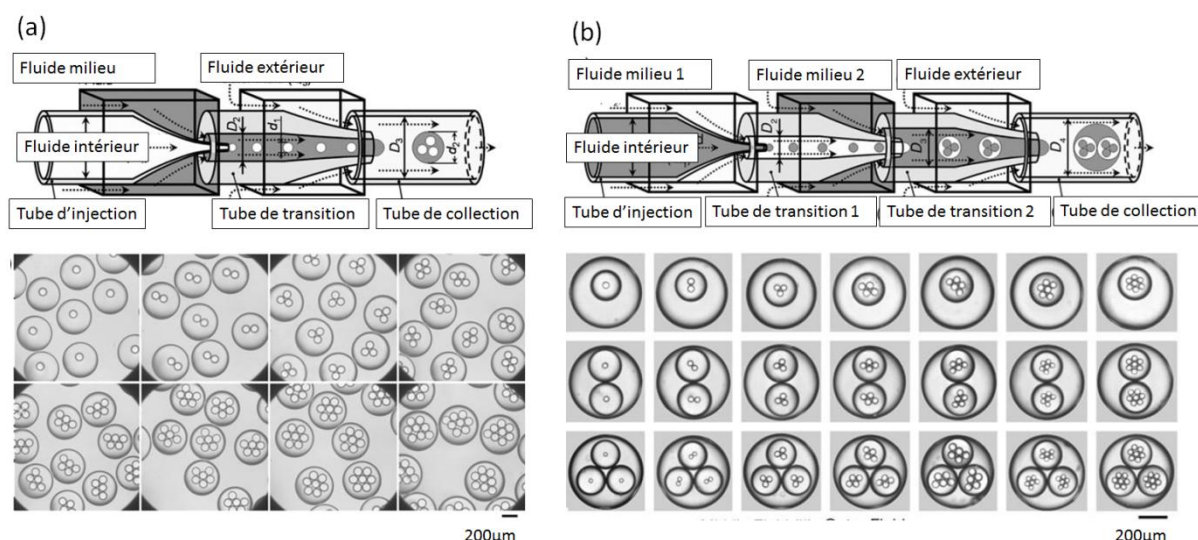


Figure 28 - Création de multiémulsion par géométrie capillaire a) Dispositif à deux étages, b) Dispositif à trois étages.

En imbriquant plusieurs systèmes en parallèle et en série, l’équipe de Weitz [201] a récemment développé un système permettant de créer de multiples compartiments dans lesquels peuvent être encapsulés différents réactifs. Le système ouvre des possibilités de structures de gouttes imbriquées exceptionnelles, ce qui est intéressant par exemple pour des réactions chimiques contrôlées.

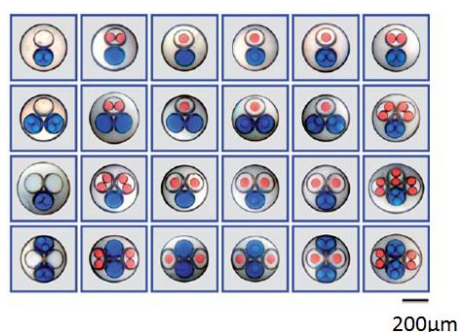


Figure 29 – Possibilité de structures proposées par l’équipe de Weitz [201].

Les émulsions présentées dans ce paragraphe sont obtenues avec une polydispersité de 2%. Ces systèmes permettent de contrôler en fonction des débits, la taille des différentes couches. Cependant, il est impossible de descendre à des couches de l’ordre de quelques micromètres. C’est ce que permet de faire de nouvelles géométries fluidiques présentées dans le paragraphe suivant.

## ❖ Formation de la multiémulsion en amont

Ce nouveau système a été proposé récemment par Abate [202] et forme une multiémulsion en une seule étape. Cette géométrie consiste en l’utilisation de MFFD en série mais plus rapprochés. Le premier microsystème fonctionne en mode jetting et le second en mode dripping. La première jonction permet la formation d’un long jet jusqu’à la seconde jonction où l’émulsion est formée. Contrairement aux autres systèmes comportant deux instabilités où sont formées les gouttes (Figure 30-a), ici une seule focalisation permet de former l’émulsion (Figure 30-b). Avec une seule instabilité, la couche extérieure peut descendre en dessous de 6 µm pour des gouttes de l’ordre de 80 µm. Pour plus de précision sur la transition entre les deux régimes, le lecteur peut se reporter à l’article d’Abate.

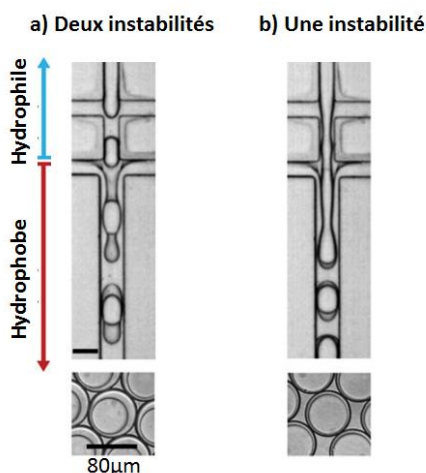


Figure 30 - a) Formation d'émulsion avec deux instabilités, b) Formation d'émulsion avec une instabilité et aspect des émulsions [202].

Ces paragraphes ont montrés que les possibilités qu'offre la microfluidique pour la formation d'émulsion sont très variées. La formation de multiémulsion est un outil intéressant dans l'optique de la production automatisée d'une encapsulation multicouche de cellules.

Après la formation de l'émulsion vient l'étape de gélification. Le prochain paragraphe présente les différentes méthodes permettant de réaliser cette étape.

### I.3.2.3. FORMATION DE CAPSULES POLYMERIQUES EN MICROSYSTEMES

La formation de capsules nécessite la manipulation de solution de polymères. Ces solutions ont des viscosités plus élevées que celle de l'eau ou bien de l'huile, la plupart du temps supérieures à 200 mPa.s. La manipulation de fluides visqueux en microsystème n'est pas un problème et la formation de capsules est reportée dans de nombreux articles: Kumacheva [203], Duncanson [204], Erni [205]...

Nous présentons ici les différents procédés de gélification utilisés en microfluidique.

#### *I.3.2.3.1. Microsystème instrumenté : photopolymérisation et changement de température*

Il existe plusieurs façons de gélifier les particules, qui dépendent bien entendu du polymère utilisé. Le polymère peut être réticulé par photopolymérisation [206][207], par changement de température (notamment utilisé pour les particules composées d'agarose)[208][209]. Dans ce cas, il faut ajouter au microsystème une instrumentation externe. C'est la méthode utilisée par l'équipe de Kumacheva [209] pour la fabrication de microparticules à base d'acrylate de taille et de forme variées (Figure 31-b). Ces formes sont fonction de la taille de l'émulsion et de la géométrie du canal de sortie au moment de la polymérisation (Figure 31-a).

Même si les méthodes de photopolymérisation ont montrées pour des temps d'exposition faibles (inférieurs à 30 s), de bons résultats quant à la viabilité des cellules encapsulées [210][211], l'étape de gélification qui fait intervenir des ultra-violets reste agressive pour les cellules. Les gélifications effectuées par changement de température (comme pour l'agarose) ne sont pas très toxiques (suivant la gamme de température nécessaire) mais il est difficile de contrôler précisément un gradient de température. Le moindre changement peut jouer sur la viscosité du polymère et changer la taille de l'émulsion [212].



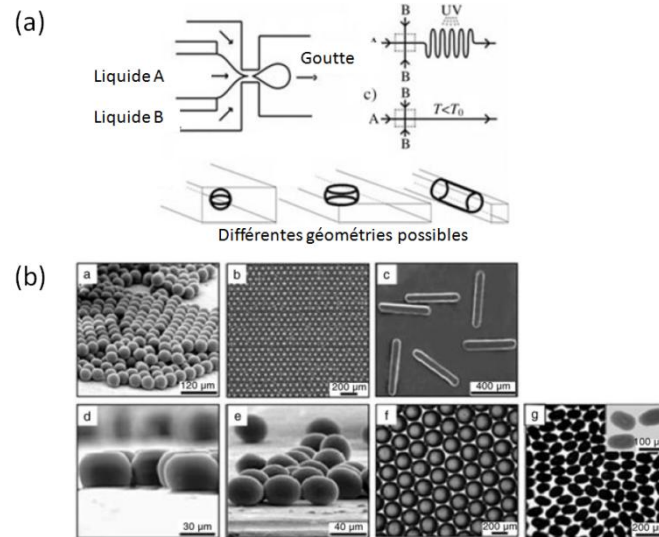


Figure 31 - Méthode de gélification par instrumentation a) Schéma des dispositifs, b) Forme des particules obtenues [209].

## 1.3.2.3.2. Gélification ionique

La gélification ionique consiste à ajouter un agent gélifiant qui diffuse vers le polymère et le gélifie. L'intégration de ce type de gélification dans un microsystème impose certaines contraintes. Pour la gélification d'alginate, l'agent gélifiant doit être mis en contact avec la solution d'alginate après la formation de la goutte. En effet, si la solution gélifiante (calcium) est apportée au niveau de la jonction des flux, il est impossible de former des gouttes car la gélification est un phénomène trop rapide. L'alginate s'étend alors en un fil avec des nœuds (Figure 32) [103]. Il est donc impératif de séparer l'endroit de formation de goutte de la gélification ou de développer des méthodes de gélification retardées dans l'huile (cf. 1.3.2.3.2). Comparé au procédé de polymérisation faisant intervenir des UV, le procédé de gélification par voie ionique est reconnu comme peu agressif pour les cellules.

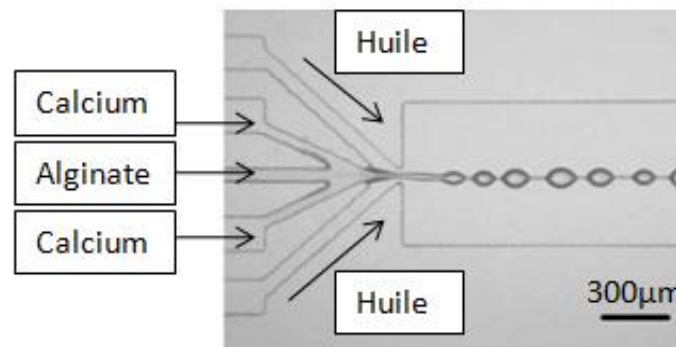


Figure 32 – Gélification au niveau de la restriction du MFFD : formation d'un filament avec des nœuds [103].

L'intégration de l'étape de gélification dans le microsystème est un challenge important et un verrou technologique actuel. Le procédé de gélification est déterminant pour la forme finale des capsules. L'objectif est de garder la sphéricité et la monodispersité des gouttes formées au niveau de la jonction T ou du MFFD du microsystème.

Il existe majoritairement deux méthodes de gélification possibles pour l’alginate:

- La gélification externe. Les ions divalents (le plus souvent du  $\text{Ca}^{2+}$  ou du  $\text{Ba}^{2+}$ ) diffusent du milieu extérieur et gélifient les gouttes en capsules. Deux types de gélification existent : les gélifications en bain externe et les gélifications intégrées en microsysteme.
- La gélification dite interne. L’alginate est mélangé à une forme non active de gélifiant. La phase continue contient un élément qui va libérer cet agent pour gélifier l’alginate. Il s’agit le plus souvent d’un complexe de calcium insoluble dans la phase du polymère : par exemple des nano-cristaux de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ). Dans ce cas, les ions calcium sont relâchés en abaissant le pH de la solution. Cette méthode de gélification interne a été initialement introduite par D. Poncelet [213].

### ❖ La gélification externe

Au contraire des systèmes macroscopiques où les gouttes sont créées dans l’air, en microfluidique les gouttes sont créées en flux d’huile. Les méthodes externes de gélification comportent soit un changement de phase des gouttes de polymère, de la phase huileuse vers une phase aqueuse gélifiante, soit une gélification dans le fluide porteur.

- Les gélifications en bain externe gélifiant aqueux [214][215]

La gélification en bain externe reproduit le schéma d’une encapsulation avec un dispositif macroscopique. Elle consiste à créer l’émulsion dans un microsysteme du type jonction T (Figure 33-a), MFFD ou géométrie tridimensionnelle, puis à gélifier les gouttes en les plongeant dans un bain d’ions gélifiants externe au microsysteme.

Au fur et à mesure du fonctionnement du système, le bain de gélification externe se recouvre d’une couche d’huile. Pour gélifier, les gouttes d’alginate doivent traverser cette interface huile/calcium. L’équipe de Capretto a montré que ce transfert s’accompagne d’une déformation de la goutte (Figure 33-b). La goutte se retrouve figée en forme de larme. Les gouttes obtenues ne sont donc pas sphériques (Figure 33-c). De plus, dans la phase d’huile les gouttes peuvent coalescer, le coefficient de polydispersité est donc important entre 15 et 30 % [215]. Huang et al [214] utilise également cette méthode pour la production de capsules d’alginate mais aucune photo de capsule n’est fournie.

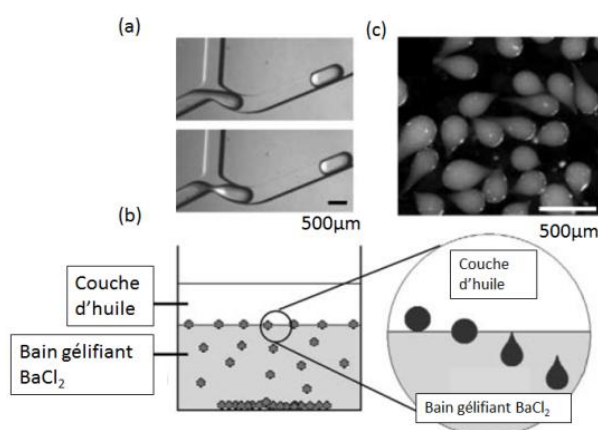


Figure 33 – Etude de Capretto : déformation de gouttes à l’interface huile et bain gélifiant a) Création de gouttes par un MFFD, b) Schéma de déformation des gouttes à l’interface, c) Allure des capsules [215].

D’autres systèmes qui se rapprochent encore plus des dispositifs macroscopiques sont développés. L’équipe de Huang [216] développe un système pneumatique avec vibrations. Ce système permet de déposer à la

surface d’huile des gouttes d’alginate d’une taille contrôlée par la fréquence de vibration (cf. système macroscopique). Les gouttes obtenues passent l’interface et gélifient dans un bain de calcium. Les tailles des gouttes sont de 73µm (CV=7,8%) à 203µm (CV=3,8%) (Figure 34-a).

L’équipe de Wu [217] utilise une jonction T pour introduire dans le flux d’alginate des bulles d’air. Ces bulles poussent l’alginate à former une goutte en dehors d’un capillaire dans la couche d’huile. La taille de la goutte d’alginate dépend donc de la quantité d’air injectée et de l’espacement des bulles d’air. Les tailles obtenues varient entre 70µm (CV=5%) et 350µm (CV=3,1%) (Figure 34-b).

Ces techniques permettent de limiter les coalescences entre les gouttes avant gélification mais les formes des capsules ne sont pas sphériques. L’équipe de Huang obtient très clairement des capsules en forme de larmes, pour l’équipe de Wu la déformation est un peu moins marquée. Des études de viabilité montrent que ces protocoles de gélification n’impactent pas la viabilité des cellules encapsulées. Les viabilités réalisées sur des cellules chondrocytes<sup>11</sup> sont respectivement de 96% (CV=2%) pour les travaux de Huang et de 94% (CV=2%) pour ceux de Wu.

Bien que ces méthodes ne soient pas toxiques pour les cellules encapsulées, l’obtention d’une forme sphérique est capitale pour la biocompatibilité. Il faut donc trouver des méthodes de gélification alternatives.

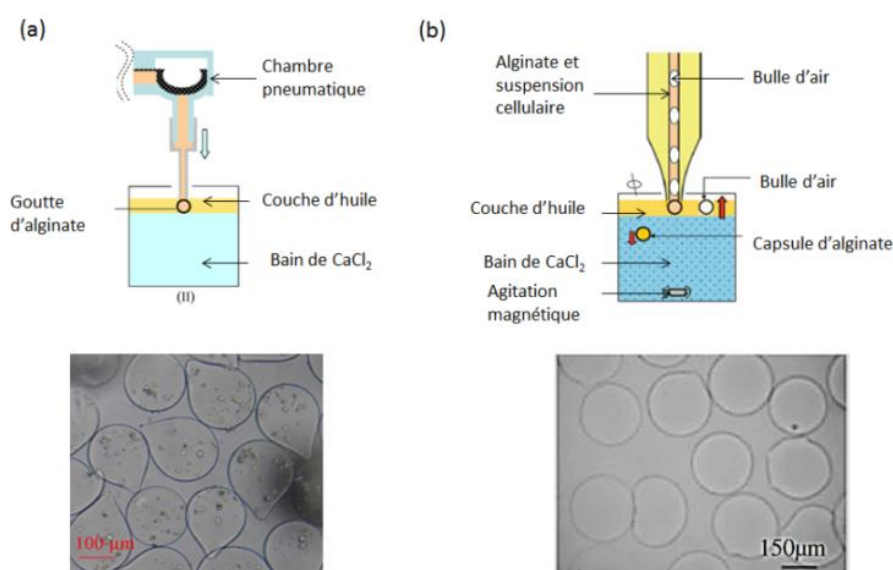


Figure 34 – Dispositifs instrumentés pour l’encapsulation externe a) Dispositif de Huang [216], b) Dispositif de Wu [217].

### - La gélification par coalescence [218][219][220]

Cette gélification se produit dans le microsysteme. Elle est réalisée par la rencontre aléatoire ou non d’une goutte d’alginate et d’une goutte de calcium. Ces deux phases aqueuses sont émulsifiées à deux endroits distincts. Deux géométries existent dans la littérature.

Sugiura [218] (Figure 35-a) a proposé un dispositif d’encapsulation tridimensionnel en silicium avec une multitude d’embouchures accolées, où sont produites des gouttes d’eau et d’alginate. La coalescence est aléatoire. Le coefficient de dispersité des capsules gélifiées est compris entre 11 et 14%, le débit de production est très élevé de 5 à 10 ml/h.

<sup>11</sup> Cellules du cartilage

Liu [219] (Figure 35-b) utilise deux jonctions MFFD à deux endroits différents pour produire les émulsions d’alginate et de calcium. Ces deux émulsions se rencontrent au niveau d’une chambre de ralentissement et coalescent. Plusieurs formes de particules (disque, filament et capsules) peuvent être obtenues par cette technique, suivant les débits utilisés. Les capsules obtenues sont relativement sphériques et monodisperses ( $CV \sim 3,6\%$ ). Le même principe est retrouvé dans l’article de Hong [221] avec la mise en série de jonctions T.

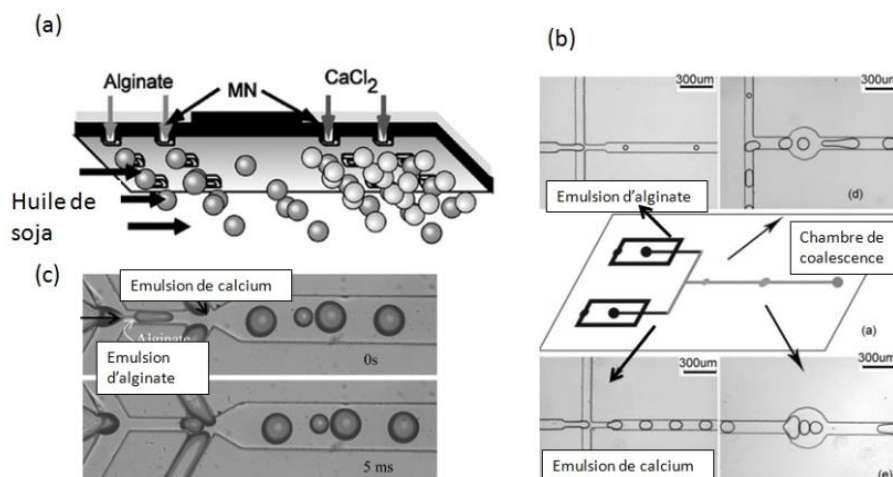


Figure 35 – Gélification induite par coalescence d’une goutte d’alginate et d’une goutte de calcium a) Dispositif MN (micro-nozzle) de Sugiura [218], b) Dispositif de Liu [219], c) Dispositif de Hong [221].

L’équipe de Weitz [220] propose un système de multiencapsulation pour isoler la coalescence d’une goutte de calcium et d’une goutte d’alginate dans une goutte d’huile (Figure 36). Les capsules obtenues sont sphériques et monodisperses ( $CV=3\%$ ). Le système fonctionne à haut débit (4500 gouttes/min) avec 70% des cas où il y a coalescence. Les limitations à ce jour sont que le système ne fonctionne que pour une gamme restreinte de débits, que la concentration d’alginate utilisée est faible 0,3% (w/w) et que l’utilisation de tensioactif est nécessaire.

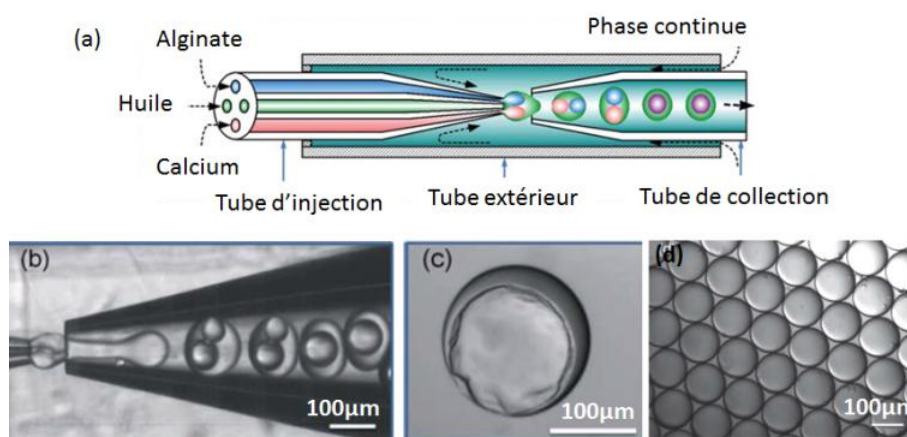


Figure 36 – Dispositif de production de capsules par multiémulsion [220] a) Schéma du fonctionnement du système, b) Encapsulation de gouttes d’alginate et de calcium dans une goutte d’huile, c) Emulsion après coalescence, d) Allure des capsules obtenues.

La méthode de gélification par coalescence demande une bonne synchronisation des émulsions donc des conditions fluidiques précises. De plus, les capsules sont récupérées avec de l’huile. Des étapes de lavages doivent donc être intégrées à la suite de ce système.

### ❖ La gélification externe dans l’huile

Cette méthode consiste à gélifier les gouttes lorsqu’elles sont encore dans le flux d’huile. Pour cela, le fluide porteur contient un agent gélifiant en suspension qui se solubilise au contact de la goutte d’alginate et la gélifie. La difficulté principale est de réussir à suspendre une forme gélifiante dans un flux organique. L’huile contenant le gélifiant peut être apportée au même niveau que la restriction formant la goutte car la gélification est moins rapide. La contrainte supplémentaire est d’avoir une gélification suffisamment rapide pour que les cellules ne soient pas en anoxie<sup>12</sup> trop longtemps.

L’équipe de Zhang [103] utilise du calcium sous forme de  $\text{CaI}_2$  dans de l’undécanol. Les capsules obtenues sont sphériques et monodisperses ( $\text{CV} \sim 3,8\%$ ). Cette gélification est reprise pour l’encapsulation et l’analyse de microbes [222]. Cependant, l’undécanol est cytotoxique. L’équipe de Kumacheva a trouvé une alternative en utilisant des cristaux d’acétate de calcium ( $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ) suspendus dans de l’huile de soja [223] (Figure 37).

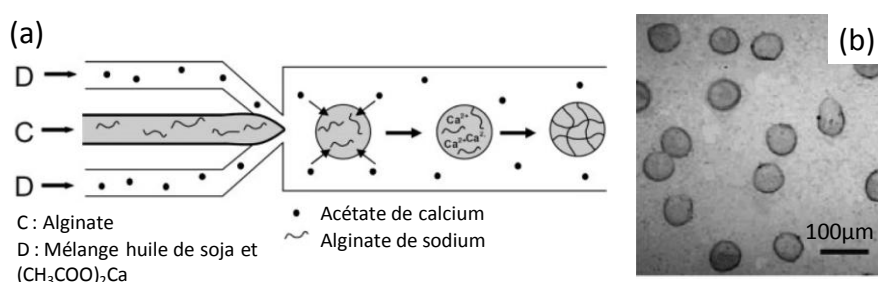


Figure 37 – Schéma de la gélification externe dans l’huile : l’huile contient une suspension d’acétate de calcium qui gélifie la goutte dans le canal de sortie [223].

Une autre méthode consiste à introduire du calcium sous forme de  $\text{CaCl}_2$  dans de l’acide oléique. L’équipe de Kim utilise ce procédé pour de nombreuses expériences pour la formation de capsules mais également de filaments [224][225]. Le calcium dans l’acide oléique se trouve sous forme diffuse et réagit rapidement avec l’alginate. L’inconvénient est que l’acide oléique est toxique, Kim l’évacue alors par un canal annexe pour éviter qu’il soit trop longtemps en contact avec les cellules [224] (Figure 38-a). Cette méthode de gélification est utilisée pour la fabrication de capsules avec un corps solide ou liquide. Un microsystème équivalent au système de multiémulsion avec une instabilité (Abate [202], Figure 30) est développé par l’équipe de Kim [225] (Figure 38-b), mais les deux premiers fluides sont miscibles.

Alors que la toxicité des cristaux d’acétate de calcium n’a pas été testée, les résultats de Kim [225] sont prometteurs pour une exposition très limitée à l’acide oléique. Pour les meilleures conditions fluidiques, la viabilité cellulaire est estimée à 90% après encapsulation et les cellules continuent de proliférer.

La gélification dans l’huile permet l’obtention de capsules sphériques et monodisperses. De premières études de viabilité ont montré des résultats encourageants. Le désavantage majeur est que les capsules sont encore récupérées dans un flux d’huile. De nombreuses étapes de lavages sont donc nécessaires pour enlever toutes traces d’huile des capsules. Des équipes travaillent récemment sur cette problématique (cf. I.4.4).

<sup>12</sup> Cellules privées d’oxygène

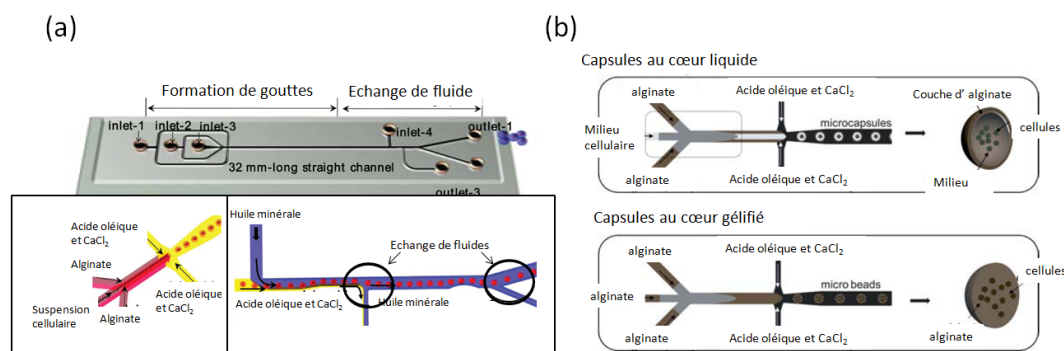
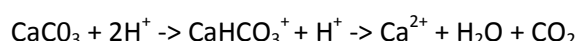


Figure 38 – Systèmes de Kim et al. utilisant de l’acide oléique pour la gélification de l’alginate a) Fabrication de capsules et évacuation de l’acide oléique pour améliorer la viabilité cellulaire [224], b) Fabrication de capsules avec un cœur solide ou liquide [225].

## ❖ Gélification interne

L’autre type de gélification est la gélification interne dont le principe est résumé sur le schéma Figure 39. Des cristaux de carbonate de calcium sont suspendus dans l’alginate et la phase continue d’huile contient une émulsion d’acide acétique. Au contact des cristaux, l’acide acétique libère le calcium suivant la réaction :



Cette méthode donne des capsules sphériques [215][213][226] (Figure 39).

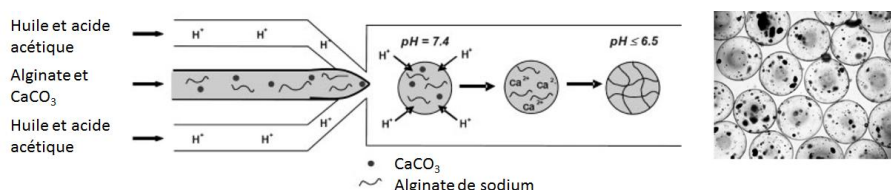


Figure 39 – Fonctionnement de la gélification interne et allure des capsules obtenues [226].

Cependant, cette réaction a un double effet. Elle libère le calcium, ce qui rigidifie la goutte mais aussi acidifie le milieu autour de la capsule formée. Cette méthode est utilisée pour l’encapsulation de cellules par plusieurs équipes [227][224][225] ainsi que pour d’autres applications en santé comme l’encapsulation d’hémoglobine [228].

L’équipe de Workmann [226] utilise cette gélification pour l’encapsulation de trois lignées cellulaires. La perte de viabilité après un jour d’encapsulation est de 20% et diminue encore à 30% après quatre jours de culture. Cette perte de viabilité est encore plus importante pour les études de Tan [229], avec une diminution, dans les conditions optimales, de plus de près de 25% juste après encapsulation.

En adaptant la gélification interne sur un système macroscopique, l’équipe de Lacik a produit des capsules sphériques avec un taux de viabilité à plus de  $90 \pm 2\%$  sur des cellules pancréatiques de souris MIN6, viabilité mesurée une demi-heure après encapsulation. Cependant, sur des cultures primaires, les résultats sont moins bons puisque la viabilité est de  $71\% \pm 4\%$  après le procédé et  $35 \pm 6\%$  après 10 jours de culture [230].

Comparé à la gélification externe, la gélification interne nécessite une exposition à un pH acide, ce qui limite son utilisation pour l’encapsulation de cellules [223]. Avec cette méthode, les capsules sont aussi récupérées en bain d’huile, des lavages sont donc nécessaires après encapsulation.



## 1.3.2.3.3. Combinaison des méthodes pour la gélification

La gélification externe en bain de calcium est une méthode de gélification non toxique pour les cellules, en revanche les formes obtenues ne sont pas satisfaisantes. Au contraire, la gélification externe en flux d’huile ou la gélification interne donnent des capsules sphériques. L’impact sur la viabilité des cellules reste encore à ce jour discutable et dépend des paramètres systèmes (temps d’exposition à l’huile, concentrations en  $\text{CaCO}_3$ ...). Le défaut commun de ces méthodes est que les capsules sont récupérées en bain d’huile. De nombreuses étapes de lavages sont nécessaires afin d’éliminer toute trace d’huile potentiellement toxique pour une implantation et difficilement homologable.

Les systèmes ou procédés présentés ici combinent les différentes méthodes de gélification décrites précédemment afin de répondre aux contraintes requises pour l’encapsulation de cellules : sphéricité et monodispersité, non toxicité et récupération en bain aqueux.

La méthode de gélification externe dans l’huile peut être combinée avec une gélification en bain externe. Ainsi les capsules obtenues sont sphériques et récupérées en bain aqueux. Cette idée est exploitée dans les travaux de S. Le Vot [79] et plus récemment dans ceux de l’équipe de Workmann [231].

Dans la thèse de S. Le Vot, des cristaux d’acétate de calcium suspendus dans l’huile commencent la gélification de la goutte avant qu’elle ne finisse sa gélification dans un bain de calcium (Figure 40-a). Cette méthode est appelée méthode de pré-gélification.

Les travaux réalisés par l’équipe de Workman portent sur une étude plus large de l’impact des conditions de gélification (viscosité du bain de gélification, hauteur de collecte et tension interfaciale...) sur la forme des capsules obtenues. La forme sphérique est obtenue sur le même principe; en ajoutant un agent pré-gélifiant ( $\text{CaCl}_2$ ) dans la phase organique du n-decanol avant que les gouttes ne tombent en bain externe de baryum (Figure 40-b).

Rappelons que cette idée de pré-gélification a été en premier lieu proposée par Zimmermann sur un procédé macroscopique (pré-gélification par cristaux de  $\text{BaSO}_4$  puis gélification en bain externe) [17](Figure 16).

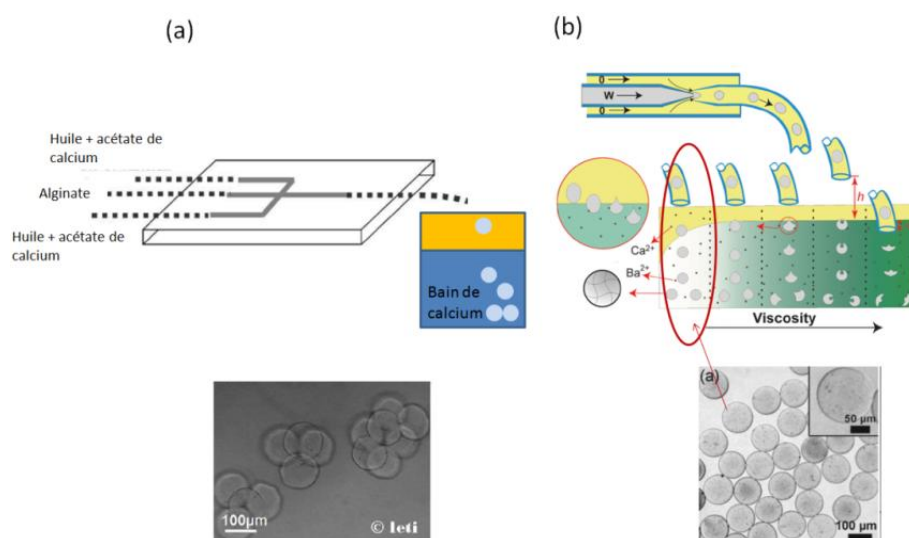


Figure 40 – Capsules sphériques obtenues après pré-gélification dans l’huile a) Par acétate de calcium [79], b) Par  $\text{CaCl}_2$  [231].

La méthode de gélification dans l’huile peut être également combinée à un module de transfert des gouttes de la phase huileuse vers une phase aqueuse. Très peu de systèmes existent actuellement car la difficulté est de transférer les gouttes au travers de deux phases non miscibles sans les déformer.

Le dispositif de Wong transfère des capsules gélifiées en interne vers une phase aqueuse avec un module de transfert [232]. Le dispositif de Deng utilise le modèle de gélification de coalescence de Sugiura pour former les capsules puis les transfère avec un module de drainage en phase aqueuse [233]. Enfin, sans étape de gélification, l’équipe de Matosevic met en place un système permettant de dévier des vésicules depuis une phase d’huile vers une phase aqueuse [234]. Ces dispositifs et leurs performances seront plus longuement détaillés dans le chapitre IV, puisqu’ils se rapprochent du microsystème développé pendant cette thèse.

Des dispositifs tridimensionnels sont aussi à l’étude pour réaliser des hydrogels de façon continue, en récupérant les capsules en phase aqueuse. Les dispositifs proposés par Martinez [235] et Ren [236] en sont des exemples. Cependant, sans pré-gélification les gouttes se déforment toujours au passage de l’interface (Figure 41).

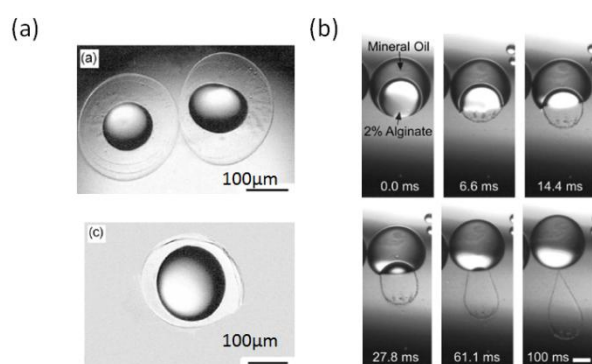


Figure 41 – Capsules obtenues par dispositif 3D et transfert en phase aqueuse a) Encapsulation de gouttes d’huile dans des coques d’alginate[236], b) Transfert d’une goutte d’alginate d’une double émulsion en phase gélifiante [235].

## I.4 AVANTAGE DE LA MICROFLUIDIQUE

### I.4.1 Propriétés des capsules

#### I.4.1.1. LA TAILLE

Les techniques microfluidiques permettent de descendre à des capsules d’une taille inférieure à 200 µm avec une faible dispersité en taille de 1 à 2% [153]. Cela ne peut pas être réalisé par les systèmes macroscopiques actuels.

Les avantages d’une telle diminution de taille pour l’encapsulation de cellules sont discutés au travers de plusieurs articles et sont nombreux :

- Une optimisation des phénomènes de diffusion des nutriments, de l’oxygène et de l’insuline. L’îlot est donc mieux irrigué et plus réactif au besoin en insuline [237].

Les tailles des îlots de Langerhans sont polydisperses entre 500µm et 50µm. Il a été reporté que les îlots les plus performants sont les îlots les plus petits [238]. Sans négliger l’encapsulation des îlots les plus gros, il est important de pouvoir adapter au mieux la taille de la capsule pour les îlots de 50µm pour promouvoir leur survie.



D’autre part, des recherches sont en cours d’investigation sur la formation d’îlots de taille contrôlée. Même si leur performance *in vivo* n’a pas encore été démontrée, la perspective de former des amas plus petits et de les encapsuler dans des capsules d’une taille adaptée est prometteur [239].

- Une limitation du volume de la greffe. De nouvelles zones d’implantation peuvent être envisagées [237] car la cavité péritonéale n’est pas le meilleur endroit pour l’implantation.
- Une limitation de la réponse immunitaire. La réponse immunitaire est, dans plusieurs articles, reportée comme plus faible pour une taille de capsule plus petite [240][19]. Ces études restent cependant controversées car d’autres articles prétendent le contraire [237].

Certaines équipes relèvent plusieurs inconvénients :

- En diminuant la taille, les capsules deviennent plus perméables aux petites molécules du système immunitaire. Une capsule plus grande piège les molécules dangereuses par des interactions électrostatiques. Plus la taille de la capsule est petite et moins ce piège est efficace. En contrepartie, la porosité doit être bien contrôlée [129]. Ce même problème est cité par De Vos [2] pour la pénétration de cytokines.
- Les capsules plus petites adhèrent plus facilement sur la surface de la cavité péritonéale, il est donc difficile de récupérer les capsules si nécessaire après implantation.
- Pour beaucoup, le risque sous-jacent d’une diminution de la taille des capsules est d’augmenter le nombre d’îlots mal encapsulés (protrusion d’îlots) qui entraînent des réactions immunitaires [37]. La protrusion est provoquée par un déplacement de l’îlot lors de l’impact de la goutte dans la solution gélifiante. Ce problème reste donc à quantifier pour les systèmes microfluidiques où la gélification est intégrée en flux dans le microsystème.

L’avantage d’une diminution de taille pour l’encapsulation est encore discuté. Cependant, la microfluidique offre une liberté de taille importante (de 50  $\mu\text{m}$  à 400  $\mu\text{m}$ ) comparé aux systèmes macroscopiques.

### I.4.1.2. LA VISCOSITE

Les possibilités de manipulation de fluides très visqueux est un des autres avantages majeurs des dispositifs microfluidiques. Aucune limite n’est référencée mais des systèmes fonctionnent pour des viscosités supérieures à 2600 mPa.s [185], tout en gardant la monodispersité et la sphéricité de l’émulsion.

L’avantage de la formation de capsule avec de l’alginate concentré (et donc plus visqueux) est la formation de capsules plus rigides et moins poreuses offrant ainsi une meilleure protection [241]. La biocompatibilité des capsules pourrait donc être améliorée via ces techniques.

De plus, l’utilisation de solutions plus visqueuses permet de limiter le déplacement des îlots vers la périphérie lors de la gélification, ce qui empêche l’apparition de protrusion [237].

### I.4.2 Ajout de modules intéressants pour l’encapsulation de cellules

---

La microfluidique offre de multiples possibilités pour la manipulation de gouttes en flux : tri de gouttes, fusion de gouttes, mélange de gouttes, séparation de gouttes... [242][243]. Ces techniques, appliquées à l’encapsulation d’îlots de Langerhans, pourraient apporter des solutions intéressantes à des problèmes encore non résolus par les techniques actuelles d’encapsulation :

- L’encapsulation systématique d’un seul îlot par capsule, ce qui limiterait les nécroses successives des îlots et améliorerait la survie globale du greffon.
- Le tri d’îlots en taille en entrée du système d’encapsulation, pour ensuite adapter la taille de la capsule à la taille de l’îlot.
- Le tri, post encapsulation, des capsules vides et des capsules pleines, ce qui limiterait l’implantation d’un volume inutile.
- L’automatisation complète du procédé d’encapsulation afin de fournir des capsules reproductibles au sein d’un même lot.

### I.4.2.1. ENCAPSULATION DE CELLULE UNIQUE

Plusieurs stratégies sont adoptées pour réaliser l’encapsulation d’une cellule ou d’un nombre précis de cellules. Sans modification particulière, la répartition de cellules se fait suivant la loi statistique de Poisson [244]. Cette loi démontre qu’augmenter le nombre de capsules avec une seule cellule implique une diminution de la densité des cellules dans le flux d’alginate et donc une augmentation du nombre de capsules vides. Pour contourner cette loi plusieurs stratégies sont mises en place :

- Synchronisation et alignement des cellules avant l’étape d’encapsulation. Le but est de contrôler l’espacement inter-cellules et de synchroniser cet espacement avec la formation de gouttes [245]. Kemna [246] reporte un rendement de 77% d’encapsulation de cellules uniques.
- Contrôle de la formation de gouttes au moment où la cellule arrive [247][248] (Figure 42). Il n’y a donc plus de problème de capsules vides, qui augmentent le volume de la greffe sans apport thérapeutique.

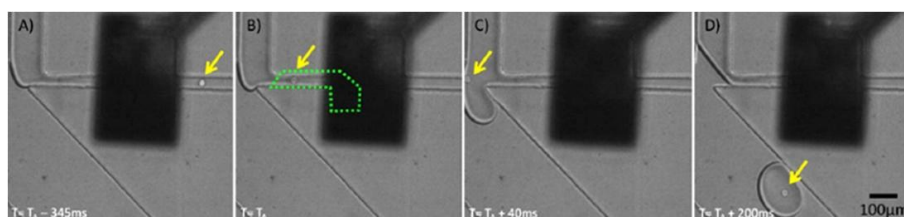
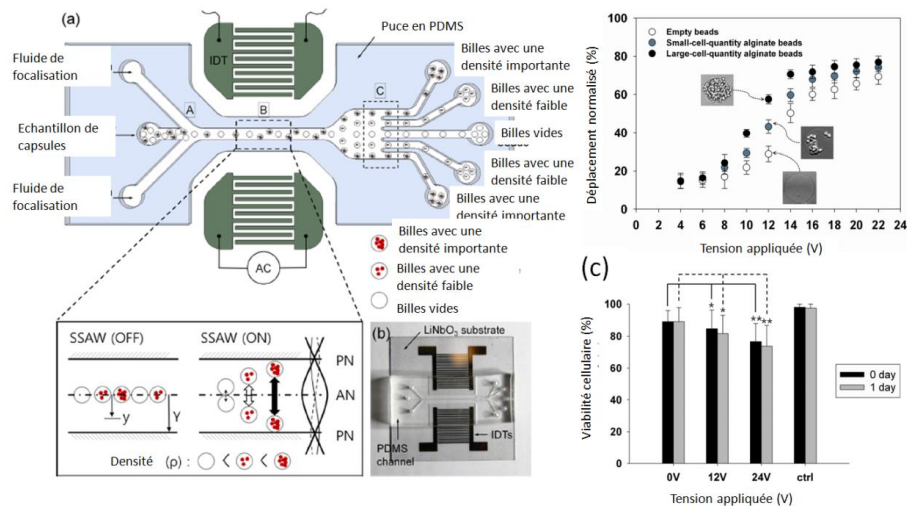


Figure 42 – Formation d’une goutte à l’arrivée d’une cellule par un système pneumatique [247].

### I.4.2.2. MODULE DE TRI

Des dispositifs permettent de pouvoir trier les particules en taille [249]. La microfluidique envisagée peut être passive (variation de géométrie de chambre et conditions hydrodynamiques [250][251][252] ou active (méthode optique [253], électrique [254], pneumatique [255] et acoustique [256][256][257]). Il est possible par exemple de séparer des plaquettes d’un échantillon sanguin avec une pureté de 98% [258].

A défaut d’avoir un microsystème contrôlant le nombre d’îlots par capsule, les capsules peuvent être triées après afin d’éliminer les capsules vides. Pour cela, l’équipe de Nam [259] utilise l’acoustophorèse (Figure 43). Le principe est que le déplacement latéral dans un canal entre deux électrodes est proportionnel à la densité des particules (à diamètre similaire) (Figure 43-a). Cette densité varie en fonction du nombre de cellules encapsulées (Figure 43-b). Les capsules pleines sont alors séparées des capsules vides avec un rendement de 97 % et une fréquence de 2300 gouttes/min. La diminution de la viabilité des cellules, après exposition à la tension, est de l’ordre de 5 à 10% (Figure 43-c).



## I.4.2.3. MODULE D'ANALYSE

Dans le cadre d'étude sur les îlots de Langerhans, des systèmes microfluidiques ont été développés pour analyser la viabilité et la fonctionnalité des îlots après isolation du donneur. Mohammed [260] présente un système microfluidique pour la culture d'îlots franchement isolés et pour déterminer leur viabilité et leur sécrétion d'insuline. C'est un bon moyen d'évaluer rapidement si les îlots sont implantables. Lamontagne [261] mesure la sécrétion de zinc des îlots par fluorescence dans un canal microfluidique.

## I.4.3 Fréquence de fonctionnement

L'encapsulation de cellules, notamment dans une perspective d'implantation, nécessite l'encapsulation d'un nombre important de cellules en un minimum de temps.

Les systèmes microfluidiques fonctionnent à plus basses fréquences que les systèmes macroscopiques actuels de microencapsulation, mais l'avantage est qu'ils peuvent être mis en parallèle. Les articles [262][263] décrivent la formation de gouttes d'eau tandis que Romanowsky [264] (Figure 44) présente bien un système de production de capsules. Le débit est évalué à 1kg par jour pour une concentration d'alginate de 0,25% (w/w). La dispersité en taille est de 6%. La fréquence de fonctionnement n'est donc pas un critère rédhibitoire pour la microfluidique.

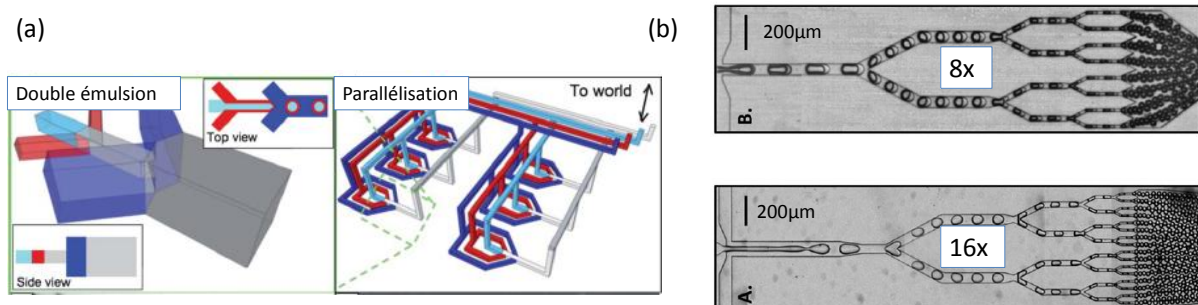


Figure 44 – Production de gouttes à haut débit, a) Production de goutte à double couche et parallélisation des systèmes [264] b) Division de gouttes simple et double émulsion [263].

## I.4.4 Automatisation des procédés

L’atout de la microfluidique est que les modules présentés précédemment peuvent être combinés afin d’automatiser un procédé biologique entier de façon reproductible. Dans sa revue, Kintses [158] présente la microfluidique comme les pièces d’un puzzle dont les combinaisons sont infinies (Figure 45). De plus, la taille des composants permet de facilement isoler l’ensemble du procédé de tout contact avec l’environnement extérieur, évitant ainsi les risques de contamination.

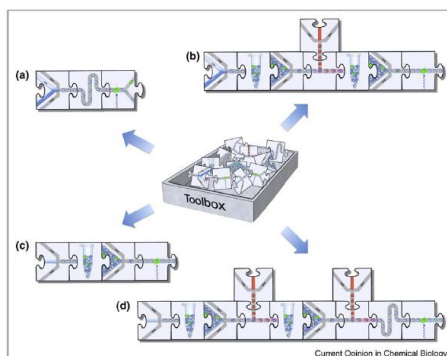


Figure 45 – Résumé des possibilités de la microfluidique : Combinaison de plusieurs modules (formation de gouttes, fusion de gouttes, séparation, lecture par fluorescence...). Pour plus de descriptions concernant les applications possibles se reporter à la référence [158].

Concernant l’encapsulation de cellules, des systèmes d’encapsulation multicouches automatisés commencent à apparaître. Tout comme quelques systèmes macroscopiques, le souci d’automatisation pour une meilleure reproductibilité de fabrication des capsules est présent.

Les systèmes de Rondeau [265] et Chang [266] en sont des exemples : des couches supplémentaires sont ajoutées sur le polymère gélifié pour former des encapsulations multicouche. Rondeau forme des capsules de PEO (poly-éthylène oxide) avec une couche de co-polymères polylactide et de polyvinylpyrrolidone pour l’encapsulation de principes actifs comme la vitamine B12 (Figure 46-b). Chang, avec un système de vannes pneumatiques, forme des gouttes qui successivement coalescent avec l’alginate pour réaliser des capsules alginate/PLL/alginate (Figure 46-a). Aussi, le développement impressionnant de systèmes de multiémulsion devrait laisser prochainement place à de nouveaux systèmes d’encapsulation automatisés. La production d’hydrogels est déjà possible [235].

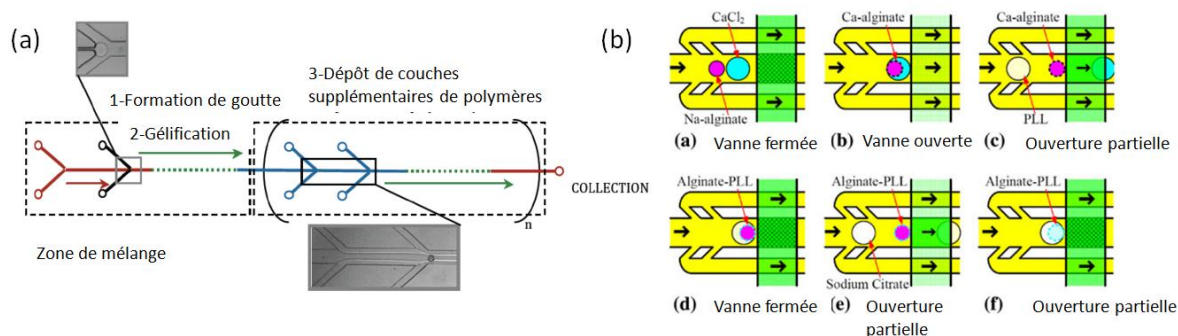


Figure 46 – Encapsulation multicouche en microsystemes a) Système de Rondeau : dépôt de couches successives, b) Système de Chang : multicouche par coalescences successives de gouttes.

La microfluidique pourrait aider à standardiser les techniques d’encapsulation et rendre le procédé plus reproductible (temps de gélification, temps de contact avec la solution de polycations, protocole de rinçage...). De plus de nombreux modules pourraient être ajoutés : tri d’îlots en taille avant encapsulation, tri des capsules vides...

### I.5 POSITIONNEMENT DU PROJET DE RECHERCHE ET PRESENTATION DES OBJECTIFS

Les investigations menées actuellement sur l’encapsulation de cellules se focalisent principalement sur deux points : le développement de nouveaux matériaux ainsi que la mise au point de nouvelles méthodes de gélification associées. Ces deux axes de recherche sont essentiels pour améliorer la biocompatibilité des capsules et jouent un rôle décisif dans la réussite d’une implantation.

Ce projet de recherche ne prétend pas au développement de nouveaux matériaux ou de nouveaux procédés chimiques de gélification. Aussi, pour réaliser nos expériences, nous avons choisi de travailler avec le polymère encore le plus utilisé pour l’encapsulation monocouche de cellules : l’alginate.

En revanche, peu de recherches sont aujourd’hui conduites pour développer de nouvelles techniques de production de capsules. Pourtant, c’est bien la technique qui définit la taille des capsules ainsi que leur monodispersité qui sont aussi des points cruciaux pour la biocompatibilité.

Les techniques actuelles macroscopiques répondent plus ou moins bien à ces critères comme nous l’avons vu I.3.1. De plus, ces techniques ne permettent pas de fournir des capsules selon un procédé reproductible car les procédés utilisés impliquent de multiples étapes manuelles comme des lavages successifs dans du sérum physiologique ou bien de nombreux changements de bain pour l’encapsulation multicouche. Certaines équipes commencent cependant à se questionner sur ce problème de reproductibilité [144][145], qui pourrait être en partie responsable du manque de reproductibilité des essais cliniques et précliniques effectués à ce jour.

La microfluidique offre de multiples possibilités pour l’encapsulation comme nous l’avons montré tout au long de ce chapitre. L’avantage de tels systèmes est la production d’émulsion de taille contrôlée même pour des viscosités importantes. Différents procédés de gélification sur puce ont été développés et présentés dans ce chapitre. Le but est de produire des capsules sphériques, monodisperses, de taille contrôlée et gélifiées selon un procédé le moins toxique possible. Les développements actuels présentent encore certaines faiblesses indiquées dans le tableau bilan Figure 47.

Ce projet de recherche s’inscrit dans cette dynamique de développement de système microfluidique innovant, appliqué à l’encapsulation de cellules. L’objectif est de développer une technique d’encapsulation de cellules qui soit automatisée pour produire des capsules suivant un procédé reproductible. La technique fluidique développée pourra être adaptée dans le futur à d’autres protocoles de gélification ou à de nouvelles compositions de capsules. Actuellement dans l’état de l’art, il existe seulement deux systèmes avec cette fonction d’automatisation. Cependant, les études ne sont pas complètes concernant, soit la sphéricité des capsules obtenues [233] soit l’impact sur la viabilité d’un procédé interne de gélification [232].

L’objectif est de fournir un système répondant aux différents critères reportés dans le tableau bilan Figure 47 : sphéricité et monodispersité des capsules, procédé de gélification non toxique et automatisé.

Type de gélification \ Contraintes techniques		Sphéricité et monodispersité des capsules	Procédé de gélification non toxique	Automatisation du procédé d’encapsulation
Gélification externe	Bain externe [214][215]	⊗ Forme de larme	☺ Bain externe de calcium Conditions physiologiques	⊗ Automatisation impossible
	Coalescence [218][219]	☹ Forme peu sphérique	☺ Procédé dans des conditions physiologiques	⊗ Lavages pour enlever l’huile
	Dans l’huile [103][223]	☺ Capsules sphériques	☹ Anoxie probable des cellules dans l’huile, non testé	
	Dans l’acide oléique [224][225]	☺ Capsules sphériques	⊗ Acide oléique toxique ☹ Limitation de la toxicité en limitant le temps de contact	
Gélification interne [226][229]		☺ Capsules sphériques	⊗ Gélification par abaissement du pH ☹ Limitation de la toxicité en limitant le temps d’exposition au pH acide	☺ Récupération en bain aqueux
Système de transfert de phase	Wong [232]	☺ Capsules sphériques	⊗ Gélification interne ☹ Pas d’étude de viabilité	
	Deng [233]	☹ Forme peu sphérique (technique de coalescence)	☺ Pas de toxicité pour une bonne évacuation d’huile	☺ Récupération en bain aqueux ☹ Lavage des traces d’huile
Pré-gélification [231]		☺ Contrôle de la forme des particules	☹ Pas d’étude de viabilité	
Multi-émulsion [235][236] [220]		☺ Capsules sphériques	☹ Pas d’étude à ce jour mais potentiel important	

Figure 47 – Tableau récapitulatif des techniques d’encapsulation actuelles et de leurs résultats vis-à-vis des contraintes pour l’encapsulation de cellules.



---

## II - MATERIEL ET METHODES

---





## Chapitre II – Matériel et méthodes

Ce chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisés tout au long de ce travail de thèse. Trois parties se distinguent : la fluïdique, l'expérimentation sur cellules et les outils de caractérisation des capsules produites. Dans les chapitres suivants, nous indiquerons pour chaque expérience menée à quelle partie du chapitre matériel et méthode se reporter.

### II.1 LE BANC EXPERIMENTAL ET LES COMPOSANTS MICROFLUIDIQUES

#### II.1.1 Le banc d'encapsulation de cellules

L'ensemble de l'instrumentation nécessaire pour l'encapsulation de cellules est présenté sur la photo Figure 48-a.

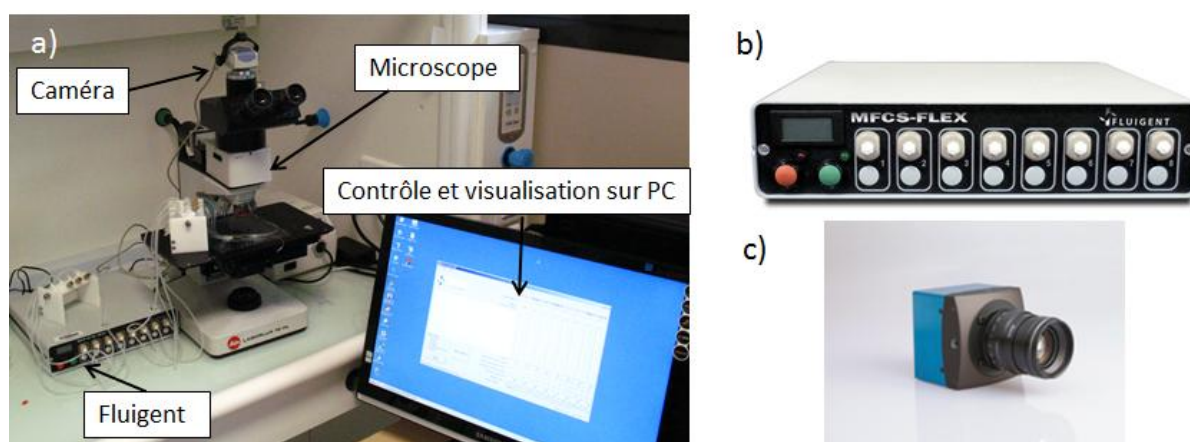


Figure 48 - Equipement du banc : a) Photo du banc expérimental, b) Fluigent à 8 voies, c) Caméra rapide

L'équipement optique pour la visualisation des phénomènes microfluidiques est composé d'un microscope (Olympus) muni d'objectif x2,5, x5 et x10 et d'une lampe (Fiber lite, MI-150). Les premières expériences ont été réalisées avec une caméra digitale (Moticam 352). Cette caméra, avec un nombre de 8 images par seconde pour une résolution de 800\*600, n'était pas suffisante pour visualiser les phénomènes fluidiques mis en jeu. Finalement, le microscope est équipé d'une caméra rapide.

Deux caméras rapides sont utilisées :

- La caméra TeledyneDALSA (Falcon 1.4M100 HG). Cette caméra permet en pleine résolution (1400 x 1024) d'avoir 100 images par seconde. Cette caméra est utilisée pour voir le fonctionnement global du dispositif mais ne permet pas d'observer le transfert des gouttes de la phase d'huile vers la phase aqueuse.

- La caméra Mikrotron (GmbH, MotionBlitzEosens) en Figure 48-c. Cette caméra en pleine résolution (1280 x 1024) fonctionne à 506 images par seconde. En réduisant la fenêtre à une résolution de 1136x268, nous avons pu monter jusqu'à près de 5000 images/s pour une exposition de 5 $\mu$ s. Le passage d'interface a pu ainsi être visualisé.

D'un point de vue fluïdique, les flux injectés dans les microsystèmes sont contrôlés en pression par un équipement Fluigent (Fluigent MFCS-8C) à 8 voies (Figure 48). C'est la pressurisation des réservoirs où se trouvent les fluides qui les met en mouvement. Le système initialement prévu pour des réservoirs de 1,5 ml et 15 ml a été adapté pour des bouteilles de 200 ml. La gamme de pression s'étend de 0 à 1000 mbar (pressions relatives). Une interface PC permet de commander ces pressions. Le temps de stabilisation du flux

est quasi-instantané et les fluctuations autour de la valeur de consigne sont négligeables. L'erreur sur la pression indiquée par le microcontrôleur est de 2,5 % [267]. Pour ces expériences, le contrôleur de pression est préféré aux seringues pour faciliter la manipulation de fluides très visqueux.

### II.1.2 La fabrication des puces microfluidiques

---

Les puces microfluidiques peuvent être fabriquées avec différents matériaux : le verre et le silicium [268], le PDMS (Polydimethylsiloxane) [269], le polyméthacrylate de méthyle (PMMA) [270]. Dans cette thèse, le matériau utilisé pour les composants fluidiques est le silicium. Le prototype final, permettant l'automatisation du procédé d'encapsulation, est un composé hybride : des puces en silicium sont collées sur un support usiné (en PMMA).

#### II.1.2.1. LES PUCES EN SILICIUM

Le silicium oxydé est un matériau, inerte, reconnu pour sa biocompatibilité. De multiples utilisations en médecine ont déjà fait leur preuve (exemple avec les MEMS implantables [271]). Les tests d'encapsulation présentés dans ce projet sont réalisés exclusivement sur des puces en silicium.

Les avantages de la fabrication en silicium sont nombreux. Les puces peuvent être produites en quantité avec une excellente reproductibilité (plaque de 50 à 100 puces). Les techniques utilisées permettent de reproduire fidèlement une géométrie avec des contraintes importantes de forme. Enfin, les puces fabriquées sont robustes, la pression n'entraîne pas de déformation des canaux, comme c'est le cas avec des polymères comme le PDMS. Les principaux inconvénients de cette filière sont le délai de conception (de 2 mois à 4 mois en fonction de la complexité du dessin et du nombre d'étapes de fabrication), ainsi que le coût de fabrication des composants.

##### II.1.2.1.1. *La fabrication*

La fabrication des puces en silicium est décrite de façon simplifiée sur le schéma Figure 49. Les canaux sont réalisés par des techniques de lithographie et de gravures successives. La résine utilisée est une résine positive. Les plaques sont ensuite découpées et les canaux sont fermés par un capot verre par scellement moléculaire (étape 15). Le scellement moléculaire permet de coller deux surfaces sans utiliser de colle ou de résine [272]. Le collage est induit initialement par les forces attractives (forces de Van der Waals) puis le renforcement du collage est réalisé par traitement thermique, les liaisons deviennent alors des liaisons covalentes (Si-O-Si).

Le scellement moléculaire est préféré à la sérigraphie afin d'éviter tout ajout de colle autant pour une question de biocompatibilité que de reproductibilité. Les premières puces réalisées par sérigraphie présentaient des dépôts indésirables de colle dans les canaux fluidiques obstruant une partie de certains canaux et modifiant ainsi les pertes de charges et les écoulements dans les puces.

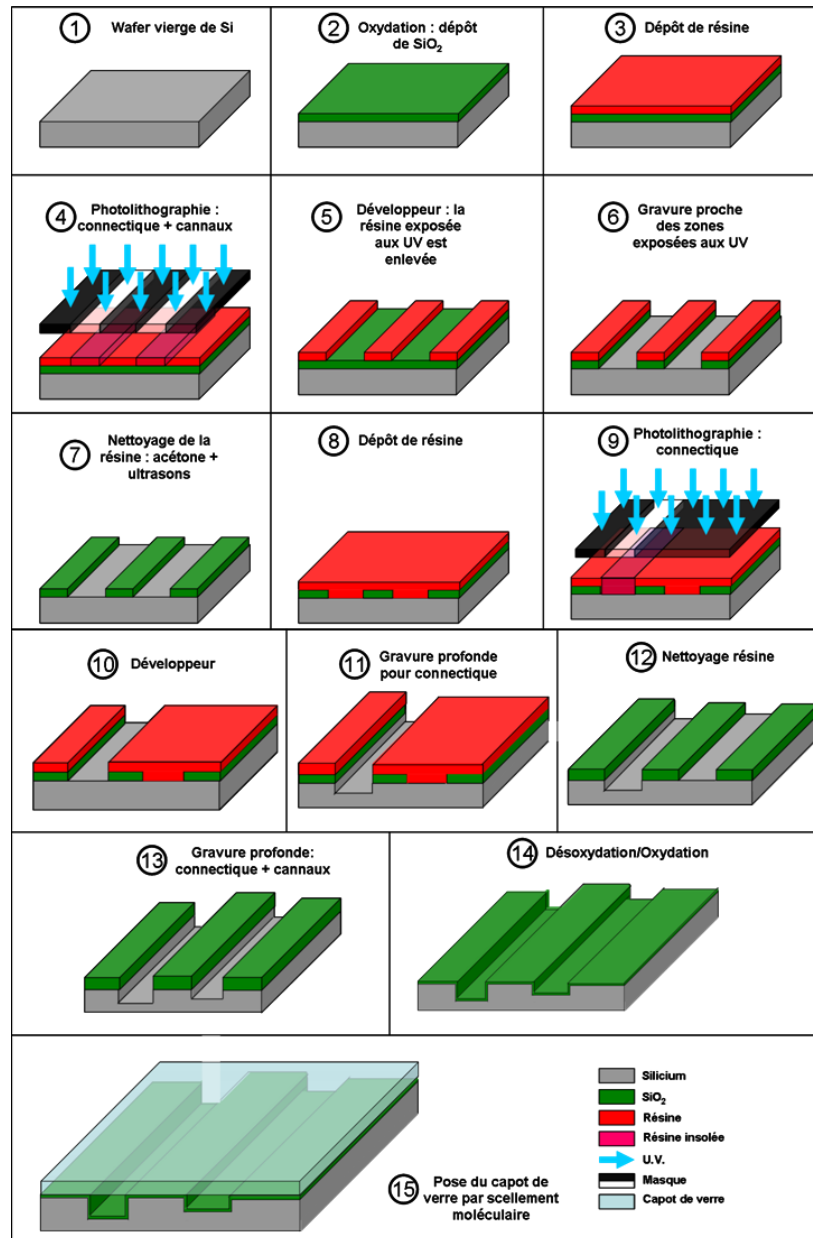


Figure 49 - Etapes de fabrication des composants CELLENC.

### II.1.2.1.2. Les différentes générations de composants utilisés

Au cours de ce travail, nous avons utilisé tout d'abord les puces fabriquées pendant la thèse de S. Le Vot, puis nous avons pu fabriquer deux autres lots de puces dont les différences sont exposées dans ce qui suit :

- Les puces de S. Le Vot ont été utilisées tout au long de ce travail. Notamment sur les travaux présentés aux chapitres III et IV. La connectique fluide de ces puces se fait par la tranche. Pour cela, elles ont deux niveaux de gravure : un niveau de profondeur 400  $\mu\text{m}$  pour la connectique et un niveau pour les canaux fluidiques de 200  $\mu\text{m}$  (Figure 50). Ceci de façon à pouvoir connecter des capillaires de diamètre le plus grand possible et limiter les pertes de charge du système. Ces puces sont collées sur des lames de verre avant d'être utilisées.

## Chapitre II – Matériel et méthodes

- Le premier lot réalisé au cours de cette thèse présente les mêmes géométries fluidiques que les puces à connectique par la tranche, avec une profondeur de gravure fluide de 200  $\mu\text{m}$ . C'est la 2<sup>ème</sup> gravure qui est traversante et qui définit la connectique d'entrée en face arrière de la puce. Les puces sont collées sur une surface PMMA où des canaux de raccord sont usinés (voir paragraphe packaging). L'avantage est qu'il n'y a plus besoin de capillaire, les pertes de charges du système sont alors limitées (Figure 50).
- Un second lot a pu être réalisé, les dessins fluidiques sont différents car ces puces sont les résultats de l'optimisation des géométries du transfert de phase (objet du chapitre IV). Ces puces ont également une connectique en face arrière. Deux lots ont été réalisés, un lot gravé à 200  $\mu\text{m}$  et un lot gravé à 500  $\mu\text{m}$  pour la production de capsules adaptées à des îlots d'une taille supérieure à 200  $\mu\text{m}$ .

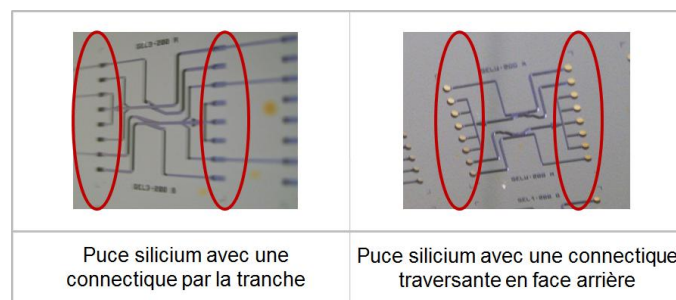


Figure 50 - Puces fabriquées et utilisées lors de cette thèse, les entrées/sorties sont entourées en rouge : a) Les puces avec une connectique par la tranche, b) Les puces avec une connectique en face arrière.

### II.1.2.2. TRAITEMENT DE SURFACE

Confidentiel

### II.1.2.3. LE PACKAGING

Confidentiel

### II.2 LA CULTURE CELLULAIRE

Les techniques d'encapsulation ont été validées in vitro sur plusieurs types cellulaires. Dans un premier temps, les procédés ont été testés sur un modèle de cellules flottantes, les Jurkat, puis sur des pseudo-îlots (lignée mRIN5-F). Lorsque que cela a été possible, les tests ont été réalisés sur des îlots humains mais nous en avons reçus qu'à quatre reprises.

Dans cette partie, les méthodes de culture cellulaire pour chaque lignée, la préparation des expériences d'encapsulation, ainsi que les protocoles d'évaluation de la viabilité sont présentés.

#### II.2.1 Les lignées utilisées

##### II.2.1.1. LES CELLULES JURKAT

Les cellules Jurkat (ATCC TIB 152, Figure 51) sont des cellules lymphocytaires T humaines. Ce sont des cellules flottantes. Elles se cultivent dans un milieu composé de RPMI + Glutamax (Gibco 1640), 10% sérum foetal de veau (Biowest-S1810) et 1% de pénicilline/streptomycine, dans des flasques 75 cm<sup>2</sup> (BD Falcon Cultured-treated). Le milieu est changé à 50% deux fois par semaine, à confluence les cellules sont passées une fois par semaine à une dilution de 10<sup>5</sup> cellules/ml.

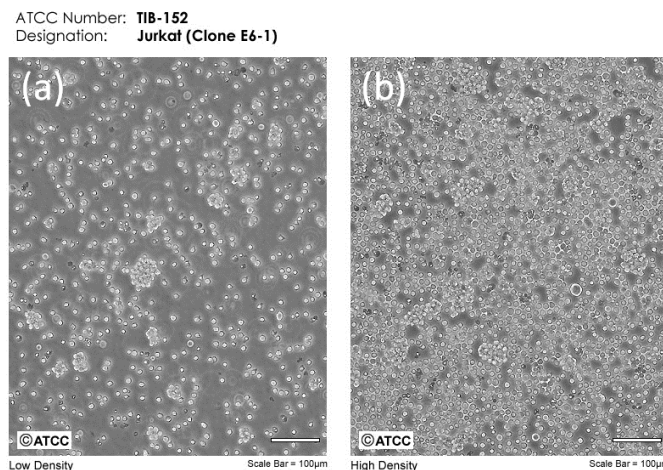


Figure 51 - Cellules Jurkat en culture, a) Après passage, b) A confluence

##### II.2.1.2. LES PSEUDO-ÎLOTS

Les îlots humains sont des cellules rares. La lignée alternative choisie pour valider les procédés d'encapsulation sont les mRIN5-F (référence ATCC CRL-11605). C'est un modèle cellulaire qui est utilisé au CEED de Strasbourg pour les études sur le diabète [274]. Ces cellules sont des cellules murines pancréatiques, qui ont la possibilité, selon leur condition de culture, de former des amas de cellules appelés pseudo-îlots.

Les cellules utilisées sont issues d'un cryotube fourni par le CEED de Strasbourg. Les cellules sont cultivées dans du milieu RPMI + Glutamax (Gibco 1640), 10% sérum foetal de veau (Biowest-S1810), 1% pénicilline/streptomycine. Ces cellules ont un temps de croissance assez lent, elles doublent tous les trois jours (Figure 52-a). Le milieu est renouvelé tous les deux jours à 50% et un passage par trypsination (0,05% Trypsin – EDTA, Gibco) est réalisé une fois par semaine. Les cellules récupérées sont centrifugées à 400 g

pendant 5 min et suspendues dans 15 ml de milieu de culture neuf. La remise en culture des cellules se fait à une concentration de 5 millions cellules/ml. La flasque est placée dans un incubateur à 37°, 5% CO<sub>2</sub>.

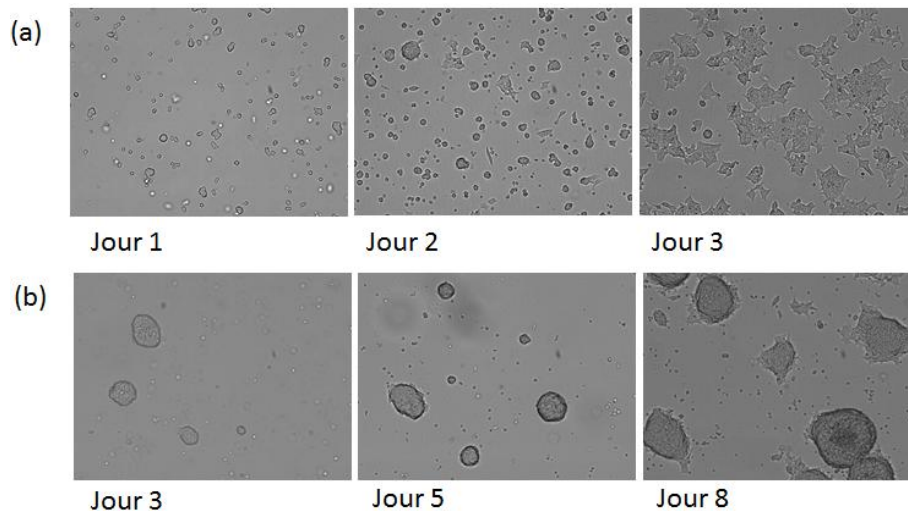


Figure 52 - Evolution de la culture des cellules mRIN5-F en fonction du temps, a) Dans l'état adhérent, b) Sous la forme de pseudo-îlots.

La formation des pseudo-îlots se réalise lors de la trypsination des cellules. La concentration cellulaire finale doit être deux fois plus élevée soit à 10 millions cellules/ml. Après trypsination, les 15 ml sont placés dans une flasque non traitée (Greiner Bio-one, mbhCellstar), qui empêche l'adhésion des cellules et permet la formation des pseudo-îlots.

Les cellules entrent en contact les unes des autres et forment des amas de cellules qui grossissent au fur et à mesure du temps (Figure 52-b). Sur une période d'une semaine, les pseudo-îlots évoluent en taille et en viabilité. Au bout de 8 jours, des nécroses apparaissent au centre des amas. Il est nécessaire de tenir compte de cette évolution pour évaluer l'impact de l'encapsulation sur la viabilité des pseudo-îlots. Les îlots ne peuvent pas être conservés plus de 7 à 10 jours.

### II.2.1.3. LES ÎLOTS DE LANGERHANS

Les îlots humains sont prélevés de donneurs décédés et préparés par l'EFS, qui les isole de leur tissu. Les îlots sont qualifiés par leur degré de pureté (qui caractérise la présence résiduelle de tissus endocrinien) et leur nombre. Ces paramètres déterminent si les îlots sont implantables. Dans le cas contraire, ils sont donnés à la recherche. Nous en avons bénéficié à quatre reprises.

Les îlots sont conservés dans un milieu composé de CRML (Gibco 21530), sérum foetal de veau 20% (Biowest-S1810), Pénicilline/Streptomycine 1%, Hepes 2% (Gibco, 15630056), bicarbonate Na 2% (Gibco, 2508-060), Pyruvate Na 1% (Gibco, 11360.039). Les cellules sont conservées en incubateur à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Les îlots ont des tailles très polydisperses entre 50 µm et 400 µm (Figure 53). La concentration des préparations en îlots est donc évaluée quantitativement par le nombre d'IEQ (nombre d'îlots avec une taille équivalente à 150 µm).



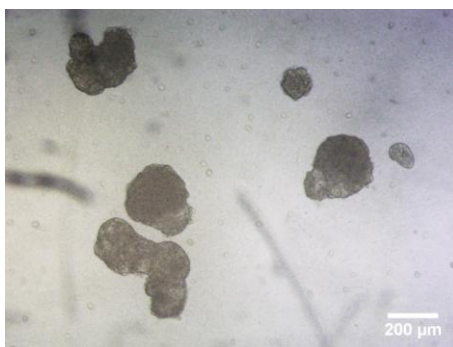


Figure 53 – Îlots humains avant encapsulation.

### II.2.2 Test de viabilité utilisé

---

L'impact du procédé d'encapsulation sur les cellules est évalué en comparant la viabilité des cellules après leur encapsulation dans le système microfluidique avec des cellules témoins restées dans l'incubateur.

#### II.2.2.1. LES CELLULES JURKAT

La viabilité des cellules Jurkat est évaluée par coloration au bleu de trypan sur une trentaine de capsules. Les capsules sont insérées dans des eppendorfs, après 5 min de sédimentation, le surnageant est enlevé et les capsules sont suspendues dans 100  $\mu$ l d'une solution de bleu de trypan à 50% (v/v) (Sigma solution 0,4%), dilué dans du milieu de culture. Après 1 à 2 minutes de réaction, les cellules sont observées au microscope (Olympus). Les cellules mortes sont colorées en bleu. Pour chaque capsule, le nombre de cellules vivantes et le nombre de cellules mortes sont comptés. Le pourcentage de viabilité est déterminé pour chaque capsule. Le pourcentage global de viabilité est déterminé comme étant la moyenne des viabilités d'une trentaine de capsules. La condition de validité est d'avoir une concentration cellulaire d'au moins 30 cellules par capsules.

#### II.2.2.2. LES PSEUDO-ÎLOTS ET ÎLOTS DE LANGERHANS

La mesure de la viabilité des pseudo-îlots et des îlots de Langerhans est réalisée par un test de fluorescence distinguant les cellules vivantes des cellules mortes. La fluorescéine diacétate (notée FDA, bioblock W0974Y, [CAS 150322-01-3]) est utilisée pour marquer les cellules vivantes, en fluorescence verte. Les cellules mortes sont marquées par du iodure de propidium (noté PI-Sigma[CAS 25535-16-4]), en fluorescence rouge.

Des solutions stocks de FDA (24  $\mu$ mol dans de l'acétone, conservation -20°C) et de PI (95 $\mu$ mol dans du PBS, conservation à 4°C) sont préalablement préparées. Au moment d'effectuer une étude de viabilité, les deux solutions d'intercalants sont mélangées dans du PBS, les concentrations finales sont de 4  $\mu$ M pour le PI et 0,67  $\mu$ M pour le FDA. 50  $\mu$ l de cette solution est mélangé à 50  $\mu$ l de milieu cellulaire contenant les îlots. La fluorescence est observée sous microscope (Axioplan 2 Imaging Zeiss, programme utilisé Cell A) (Figure 54). Pour chaque expérience, la viabilité est effectuée sur une trentaine d'îlots. Les îlots sont ensuite répartis par classe de viabilité (critère CHU Grenoble): classe A = 100% des cellules vivantes, classe B  $\geq$  50% des cellules vivantes, classe C  $\leq$  50% des cellules vivantes, classe D = 100% des cellules mortes. Les îlots sont considérés comme viables si plus de 50% des cellules le composant sont vivantes (soit la somme des classes A et B divisée par le nombre total d'îlots).



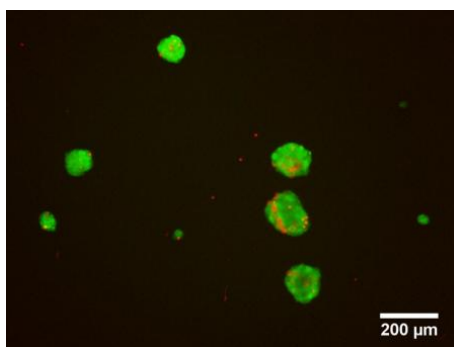


Figure 54- Test de viabilité PI/FDA mené sur les pseudo-îlots

### II.3 PROTOCOLE D'ENCAPSULATION DES CELLULES EN MICROSYSTEME

#### II.3.1 Les solutions fluidiques

##### II.3.1.1. LA PHASE CONTINUE ORGANIQUE

L'huile est le flux porteur de l'émulsion d'alginate. Pour les expériences de mise en place du procédé d'encapsulation, nous avons utilisé de l'huile de soja raffinée de chez Carl Roth (3686.1, CAS : [8001-22-7]). Les caractéristiques fluidiques de cette huile sont :

$$\eta_{oil} = 69.10^{-3} Pa.s \quad d_{oil} = 0,92$$

Pour les expériences d'encapsulation de cellules, une huile de soja hyper-raffinée de grade pharmaceutique de chez Croda (EP NP-LQ-(MH)) est utilisée :

$$\eta_{oil} = 61.10^{-3} Pa.s \quad d_{oil} = 0,89$$

##### II.3.1.2. LA PHASE PRE-GELIFIANTE ORGANIQUE

La pré-gélification est une étape nécessaire au transfert de phase. Sans pré-gélification, les gouttes ne sont pas déviées ou sont déformées pendant le transfert. Le procédé de pré-gélification garantit la sphéricité des capsules.

Cette phase de pré-gélification est faite dans l'huile. La principale difficulté est donc de suspendre une forme de calcium dans une phase huileuse. La forme choisie est des cristaux d'acétate de calcium (Fournisseur : Macco organics), déjà utilisée par l'équipe de Zhang pour gélifier les capsules en phase huileuse [223]. Les différentes méthodes de préparation de la suspension d'acétate de calcium et les résultats associés sont l'objet du chapitre III. Ces méthodes utilisent différents instruments présentés ici:

- La nano sonde (VCX500W Ultrasonic processor, Sonics) à une puissance de 125W (Figure 55). Cette sonde permet de casser les cristaux d'acétate calcium et de les disperser dans l'huile. La solution initiale utilisée est une suspension d'acétate de calcium à 4% (w/w). La suite de la préparation est présentée dans le chapitre III.



Figure 55 – Nano sonde à ultrasons utilisée pour préparer la suspension d'acétate de calcium.

à 30% (w/w).

**Confidentiel**

### II.3.1.3. LA PHASE AQUEUSE D'ALGINATE

Pour toutes les expériences de l'alginate stérile (Novamatrix SLG 100, CAS : [9005-38-3]) est utilisé. Le choix a été fait en fonction du rapport G/M, supérieur à 1,5 (donnée du fournisseur) et en fonction de la viscosité, ici entre 100 et 300 mPa.s, forte viscosité pour une concentration de 1% (w/v) (donnée du fournisseur). D'après l'état de l'art, ces choix sont des conditions favorables à la production de capsules rigides (chapitre I).

Lors de la thèse de S. Le Vot, l'alginate principalement utilisé était le Kelton (ISP Provigen). Cependant, cet alginate ne présente pas les mêmes comportements en microsystème que l'alginate ultra-pur (degré de pureté, viscosité...). Nous avons donc choisi de manipuler uniquement avec de l'alginate ultra-pur pour l'ensemble des expériences présentées. La concentration choisie est de 3% (w/v) soit 4500 mPa.s. Ce choix a été fait afin d'utiliser l'avantage qu'offre la microfluidique de produire des gouttes à viscosité élevée. La concentration est cependant prise à 2% (w/v) soit 900 mPa.s dans le cas d'encapsulation d'îlots humains afin de pouvoir se comparer aux résultats des techniques macroscopiques.

L'alginate, qui se présente sous forme de poudre, est dilué dans une solution tampon composée de 150 mM NaCl, 10 mM Hepes et ajustée à pH 7,4. La mesure de la viscosité de l'alginate est réalisée sur un rhéomètre (Brookfield DVIII Ultra). L'alginate est un fluide non newtonien, la viscosité indiquée est celle relevée pour une contrainte de cisaillement faible.

$$\text{A 3\% (w/v): } \eta_{\text{alginate}} = 4500 * 10^{-3} \text{ Pa.s}$$

$$\text{A 2\% (w/v): } \eta_{\text{alginate}} = 900 * 10^{-3} \text{ Pa.s}$$

### II.3.1.4. LES SOLUTIONS AQUEUSES DU SYSTEME

La solution de gélification des gouttes est composée de 100mM CaCl<sub>2</sub>, 80mM NaCl, 10mM Hepes et est ajustée à pH 7,4.

La solution de sérum dans lesquelles les capsules sont finalement transférées est composée de 150mM NaCl, 2mM CaCl<sub>2</sub> et 10mM Hepes et est ajustée à pH 7,4.

## Chapitre II – Matériel et méthodes

### II.3.2 Préparation des composants fluidiques

Avant toute expérience d'encapsulation de cellules, les solutions et les composants fluidiques sont stérilisés. Toutes les solutions aqueuses sont autoclavées (autoclave Systec VE-55, programme déchet liquide 120°C pendant 20 min) puis filtrées à 0,2 µm (Acrodiscupor, VWR). L'huile est également filtrée à 0,2 µm.

La paillasse d'encapsulation n'est pas sous sorbonne. Même si l'encapsulation se déroule dans un composant fermé, il est important de nettoyer la paillasse avant toute expérience sur les cellules. L'ensemble des objets restants sur la paillasse est stérilisé avec de l'éthanol 70°C puis passer sous Phagosept Spray (VWR). Les eppendorfs et tout futur contenant pour les cellules ou solutions sont autoclavés (programme déchet solide : 134°C pendant 20 min).

Concernant les puces, leur stérilisation se fait de la façon suivante. De l'éthanol à 70°C passe dans la puce pendant 5 min à 100 mbar (pression appliquée sur tous les canaux d'entrée), puis la puce est rincée par de l'eau stérile contenant 1% de Pénicilline/Streptomycine pendant 10 min à 100 mbar et enfin de l'eau stérile est injectée pendant 10 min supplémentaires également à 100 mbar.

### II.3.3 Préparation et encapsulation des cellules

Les cellules Jurkat sont récupérées par centrifugation à 300 rpm pendant 5 min. Les îlots (pseudo-îlots et îlots de Langerhans) sont récupérés par sédimentation de ~5 à 10 min afin d'éliminer au maximum les cellules individuelles. Le culot de cellules est lavé à trois reprises par du tampon d'alginate puis 50 µl de cette suspension cellulaire est mélangée délicatement à 500 µl d'alginate.

Le procédé d'encapsulation ne dépasse pas 2h. Les cellules encapsulées sont lavées à trois reprises par du milieu de culture avant d'être remises à l'incubateur (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

## II.4 METHODE DE CARACTERISATION DES CAPSULES

Après leur fabrication, les capsules sont caractérisées suivant les trois principaux critères de biocompatibilité : la forme, la résistance mécanique et la porosité.

### II.4.1 Caractérisation en forme

La capsule doit avoir une forme la plus sphérique possible pour l'implantation (chapitre I). Une macro sous le logiciel ImageJ est utilisée pour caractériser la forme des capsules obtenues. Les paramètres pris en compte sont : le coefficient de variation du diamètre des capsules noté CV, qui traduit la monodispersité de l'échantillon et les paramètres de sphéricité (circularité et ratio de forme) pour quantifier la sphéricité de façon systématique. Une simple macro disponible sur ImageJ est utilisée pour détecter les contours de chaque capsule et donner les paramètres de sphéricité : la circularité (noté c) et ratio (noté r) définis par les relations suivantes :

$$c = 4\pi \frac{Air}{Périmètre^2} \text{ et } r = \frac{MajorAxis}{MinorAxis}$$

Plus ces paramètres sont proches de 1, plus les capsules obtenues sont sphériques. Les deux paramètres apportent des informations différentes; le paramètre c est sensible aux irrégularités de contours tandis que

## Chapitre II – Matériel et méthodes

le paramètre  $r$  indique plus globalement si la forme s'approche d'un cercle ou d'une ellipse. L'étude de forme se fait sur une cinquantaine de capsules pour chaque condition étudiée.

La détection de contour sur ImageJ est précise d'environ  $\pm 2$  pixels, l'erreur sur le paramètre est alors de  $\pm 0,003$  et de  $\pm 0,001$  sur le paramètre  $r$  (base calculée pour une capsule de  $160\mu\text{m}$  de diamètre).

### II.4.2 Caractérisation de la surface

#### II.4.2.1. LE SÉCHAGE AU $\text{CO}_2$ SUPERCRITIQUE : PRINCIPE ET LITTÉRATURE

Une bille d'alginate est un matériau poreux composé à 98% d'eau. Pour observer et caractériser la structure poreuse des hydrogels, la principale difficulté est de trouver une méthode de séchage qui évapore l'eau sans détruire la structure du gel. Un séchage à l'air ambiant ou une lyophilisation ne permet pas de conserver cette porosité. Avec ces modes de séchage, la structure de la capsule se retrouve écrasée et sans porosité, formant un xérogel (Figure 56).

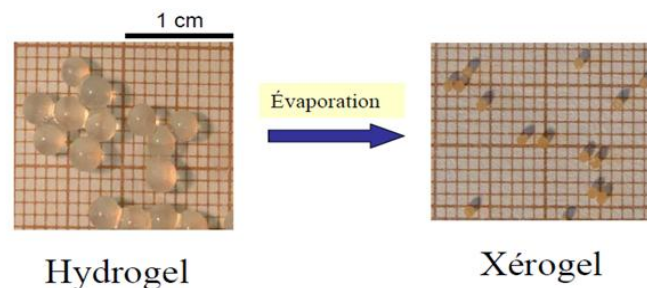


Figure 56 - Séchage standard par évaporation.

Le séchage au  $\text{CO}_2$  supercritique a déjà été utilisé pour sécher puis caractériser de telles structures [117][118]. Cette méthode permet un séchage sans ménisque (Figure 57), ce qui limite la déformation de la matrice poreuse au cours du séchage.

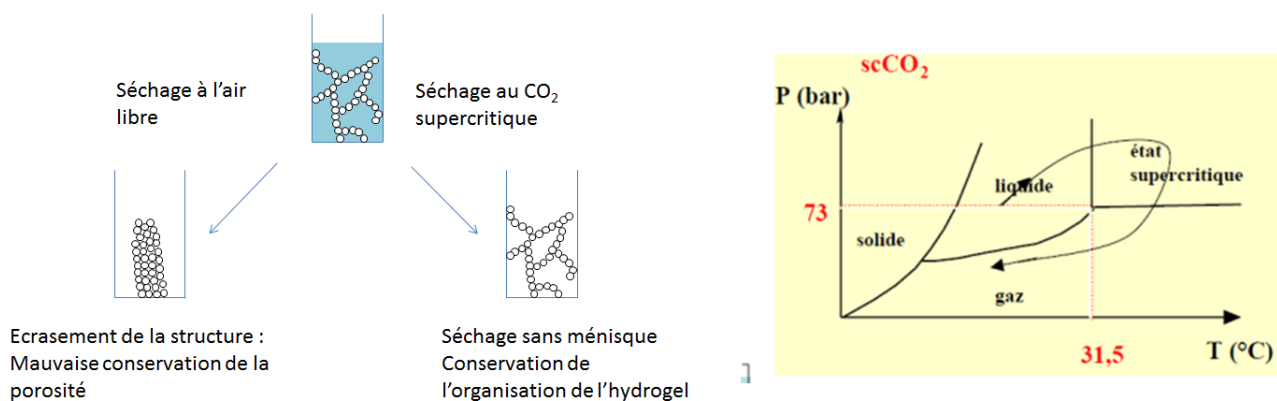


Figure 57 - Principe du séchage supercritique.

La première étape consiste à remplacer toute l'eau de la bille par de l'éthanol, miscible avec le  $\text{CO}_2$  supercritique. Dans une chambre fermée et étanche, l'éthanol est échangé avec du  $\text{CO}_2$  sous forme liquide. Le procédé consiste ensuite à dépasser le point critique pour passer le  $\text{CO}_2$  de l'état liquide vers l'état supercritique. Pour cela, la machine monte en pression (supérieure à 73 bar) et en température (supérieure à  $32^\circ\text{C}$ ), ce qui sèche le gel. Puis la pression redescend progressivement pour ne pas abîmer l'aérogel créé. L'aérogel conserve alors la structure poreuse de l'hydrogel (Figure 58). Cette structure poreuse est ensuite observée par microscopie électronique à balayage (Figure 58).

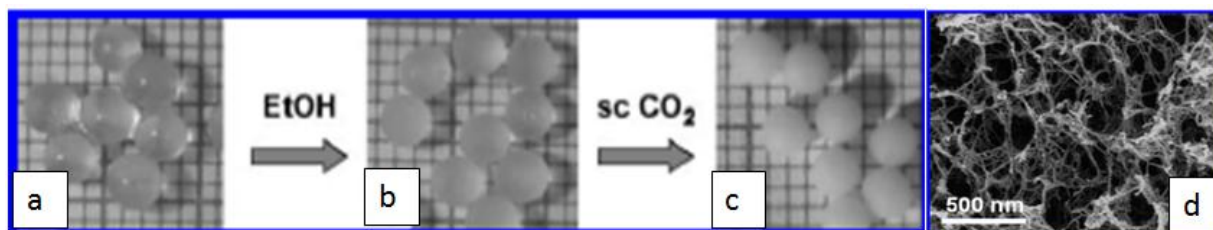


Figure 58 - Séchage de billes au  $\text{CO}_2$  supercritique : a) Hydrogel, b) Gel dans l'éthanol, c) Gel après séchage, d) Observation au MEB [118].

Bien que déjà répertorié, ni le protocole exact de séchage au  $\text{CO}_2$  supercritique, ni la préparation de l'échantillon pour l'observation sous MEB, ne sont explicitement décrits dans les publications. Il a donc fallu optimiser ces deux étapes : le séchage supercritique pour garder la structure poreuse et l'observation au MEB. Le protocole a d'abord été optimisé sur des billes de 1 mm de diamètre puis a été ajusté pour des capsules de 200  $\mu\text{m}$ .

### II.4.2.2. PROCÉDE DE SECHAGE UTILISE

#### II.4.2.2.1. Le dispositif

Une fois fabriquées, les billes sont introduites dans le dispositif de séchage réalisé en téflon. La Figure 59 montre le dispositif démonté, monté ainsi qu'un schéma de coupe. Pour laisser entrer le  $\text{CO}_2$ , des trous de diamètre 500  $\mu\text{m}$  ont été percés sur les deux couvercles en téflon. Deux vis de serrage sont utilisées pour maintenir le dispositif fermé pendant la procédure de séchage. Une fois sèches, les capsules ont tendance à être électrostatiques, pour éviter de les perdre, un anneau en téflon supplémentaire a été ajouté afin que le diamètre du dispositif corresponde à celui du porte échantillon MEB. De cette façon, après séchage, le dispositif est ouvert et directement retourné sur le porte échantillon afin que les capsules tombent sur le scotch carbone.

Pour le séchage de capsules d'une taille inférieure à 200  $\mu\text{m}$ , deux papiers filtres en téflon de porosité 5  $\mu\text{m}$  sont plaqués sous les deux couvercles afin que les capsules ne passent pas au travers des pores de 500  $\mu\text{m}$ .

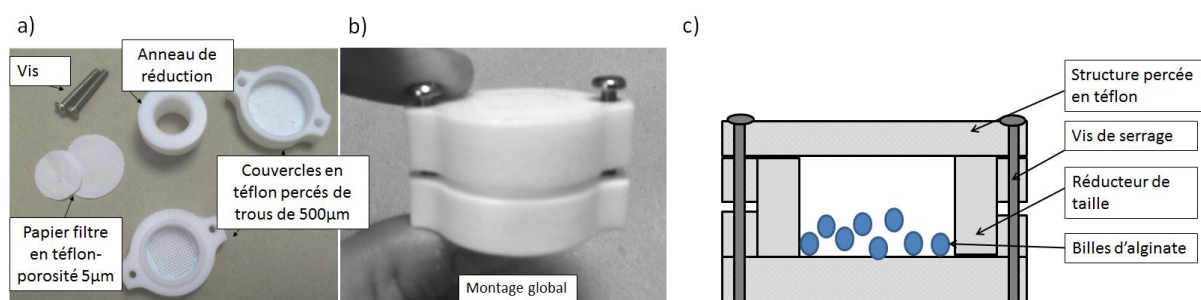


Figure 59 - Dispositif de séchage en a) Pièces détachées, b) Montage global, c) Schéma de coupe.

#### II.4.2.2.2. Le procédé de séchage au $\text{CO}_2$ supercritique

Les billes de 1 mm sont déposées dans le dispositif présenté précédemment. Ce dispositif est ensuite plongé dans des bains successifs d'éthanol de concentrations différentes (10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100% d'éthanol), afin d'échanger progressivement l'eau de l'hydrogel par de l'éthanol. Le temps de contact dans chaque bain est de 5 minutes.

Pour les capsules de 200  $\mu\text{m}$ , le lavage est effectué dans des eppendorfs. Les capsules sont suspendues puis centrifugées successivement dans les différentes concentrations d'éthanol. En effet, les filtres supplémentaires de porosité 5  $\mu\text{m}$  ne permettent pas un échange suffisant avec les différents bains.

Le dispositif et les billes sont ensuite déposés dans la chambre du sécheur supercritique (Tousimis research corporation, 815 B série C) dans 50 ml d'éthanol. La chambre de l'appareil descend tout d'abord en température (10°C) puis monte à 55 bar. Le  $\text{CO}_2$  est alors introduit sous forme liquide et s'échange avec l'éthanol (le temps d'échange entre éthanol et  $\text{CO}_2$  liquide appelé temps de purge est réglé à 20 min). Pour passer dans le domaine supercritique, la température est élevée à 40°C et la pression devient supérieure à 73 bar (voir diagramme de phase-Figure 57). Le  $\text{CO}_2$  passe alors en état critique et les billes « sèchent » sans ménisque en gardant théoriquement leur porosité initiale.

### II.4.2.3. L'OBSERVATION PAR MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE

Tout d'abord, nous avons voulu confirmer l'apport du procédé de séchage au  $\text{CO}_2$  supercritique comparé aux autres formes de séchage. Des billes d'alginate d'un même lot, 1% (w/l) d'alginate gélifiées en bain externe de calcium, sont séchées suivant trois méthodes : séchage à l'air ambiant, lyophilisation et séchage au  $\text{CO}_2$  supercritique (Figure 60). L'observation est réalisée sans métallisation sur un MEB 4000 à 20 kV, avec une distance de travail 10 mm et le détecteur In-Lens<sup>13</sup>.

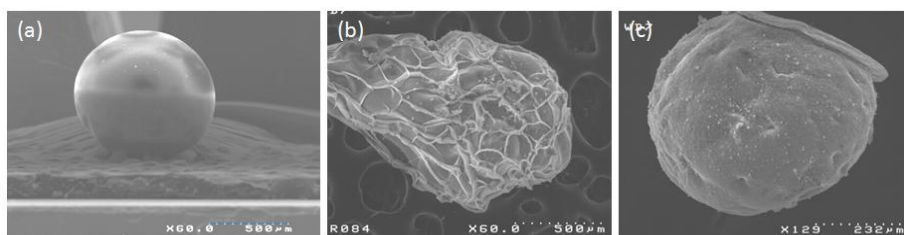


Figure 60 - Bille d'alginate en séchage a)  $\text{CO}_2$  supercritique, b) Lyophilisation, c) Séchage à l'air ambiant.

La bille séchée au  $\text{CO}_2$  supercritique garde sa sphéricité et son diamètre diminue d'environ 9% par rapport à sa taille initiale. La bille séchée par lyophilisation perd sa sphéricité et la bille séchée à l'air ambiant est totalement écrasée, la diminution de taille est de plus de 35%. Comparé aux autres méthodes de séchage, le séchage au  $\text{CO}_2$  supercritique est la meilleure technique permettant de conserver la structure du gel. La porosité observée sera donc proche de celle de l'hydrogel.

L'observation des pores est compliquée, car le gel d'alginate forme une structure fragile qui d'une part se détruit facilement sous le faisceau d'électron à trop haute énergie (Figure 61-a, b) et d'autre part charge beaucoup. Pour éviter ce problème, la bille est métallisée avec une fine couche d'or (~4 nm) qui la protège du faisceau d'électron et l'empêche de charger. L'amélioration est visible car la structure poreuse de l'alginate commence à apparaître. Cependant, la porosité semble « bouchée » et la structure de la bille lissée par le dépôt d'or (Figure 61-c et d). Ce protocole n'est donc pas satisfaisant.

<sup>13</sup> Détecteur des électrons secondaires.



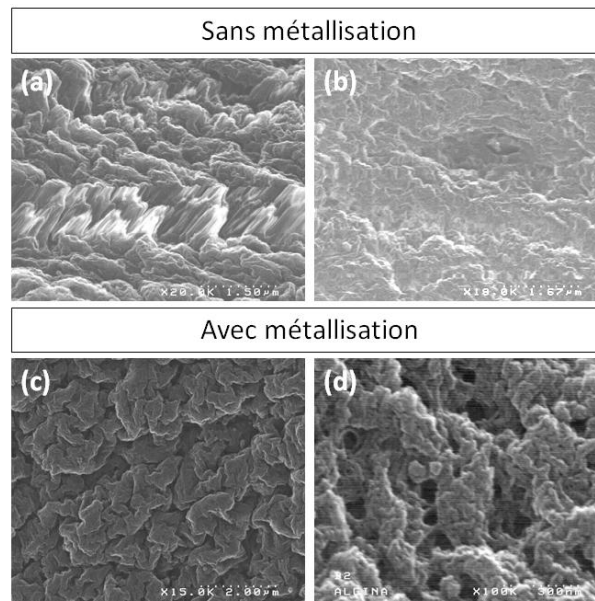


Figure 61 - Bille d'alginate de 1 mm observée au MEB a) Mauvaise stabilisation de l'image, b) Effondrement de la matière sous le faisceau d'électron, c) Image obtenue après dépôt d'une couche d'or, d) Porosité observée.

La solution alternative choisie est d'imager à faible énergie. Pour cela, nous utilisons un autre MEB, le MEB Zeiss Ultra +. L'énergie utilisée est alors  $\leq 1\text{kV}$  avec une distance de travail de moins 3mm et une ouverture de  $7,5\text{ }\mu\text{m}$ . Le détecteur choisi est le SE2<sup>14</sup>. Contrairement au détecteur In-Lens, ce détecteur permet d'obtenir la topographie de l'échantillon. L'autre avantage est que les images chargent moins vite. En contrepartie, la résolution est moins bonne qu'avec le détecteur In-Lens.

Ces conditions ont été mises au point sur des billes de 1 mm puis utilisées pour imager les capsules de taille inférieure à  $200\text{ }\mu\text{m}$  produites par le microsystème. Les résultats seront développés dans le chapitre VI.

### II.4.3 Caractérisation mécanique: Module d'Young

#### II.4.3.1. PRINCIPE ET LITTÉRATURE

Le principe a été présenté dans le paragraphe I.2.4.2.2. Comme dans la plupart des études, le texturomètre est utilisé pour évaluer le module d'Young des capsules.

Pour de faibles déformations ( $\delta/R < 0,1$  ou 20% de déformation), la formule de Hertz est utilisée:

$$E = \frac{3(1-\nu^2)}{\sqrt{2}\sqrt{R} \times \delta^{3/2}} F$$

Avec R le rayon de la bille,  $\nu$  le coefficient de Poisson considéré égal à 0,3 et  $\delta$  le déplacement du pôle de la bille pendant la compression de la bille.

#### II.4.3.1.1. Appareil de mesure et protocole

L'appareil utilisé est le texturomètre de chez Swantech (Stable microsystems texture analyser). Il est équipé d'un capteur de 500 g. La sonde de compression est une sonde circulaire de surface de contact

<sup>14</sup> Détecteur des électrons rétrodiffusés.

## Chapitre II – Matériel et méthodes

28 mm<sup>2</sup>. L'appareil est programmé pour comprimer la bille jusqu'à 95%. La sonde débute d'une distance de 500 µm par rapport à la bille et descend avec la vitesse choisie de 0,01mm/s. Les billes sont déposées dans 100 µl de solution, afin d'éviter qu'elles ne sèchent. Par ailleurs, la surface hydrophobe du support maintient les capsules dans un emplacement bien défini en dessous de la sonde. A partir du moment où la bille est détectée par l'appareil, les vingt premiers pourcents de la courbe sont utilisés pour le calcul du module d'Young selon la formule de Hertz [108]. Le reste de la courbe est analysé pour observer s'il y a eu rupture de la structure au cours de la déformation.

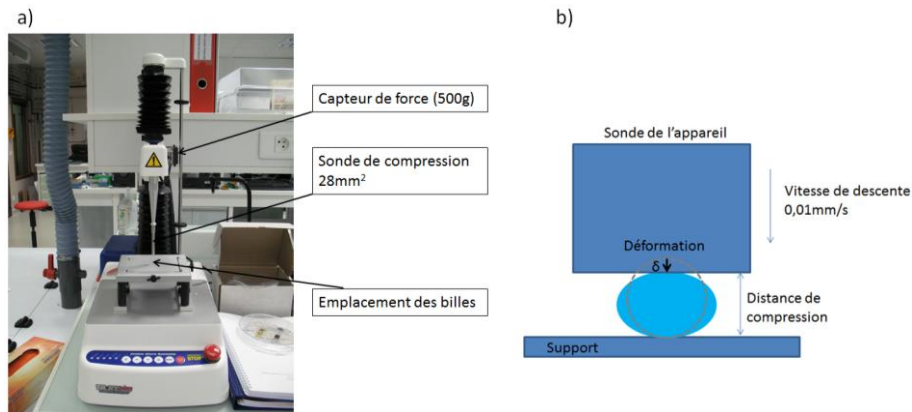


Figure 62 – a) Photo de l'équipement texturomètre, b) Schéma de compression d'une bille par la sonde du texturomètre.

### II.4.3.2. TEST DE FAISABILITE

L'appareil permet de tracer les courbes de la force appliquée sur la capsule en fonction de la déformation administrée. La Figure 63 est un exemple de courbe obtenue sur 5 billes  $\leq 200$  µm de diamètre. Une macro réalisée sous Excel détecte la droite la plus adaptée pour les vingt premiers pourcent de déformation, à partir du moment où la courbe sort du bruit. Puis la formule d'Hertz est utilisée pour calculer le module d'Young associé.

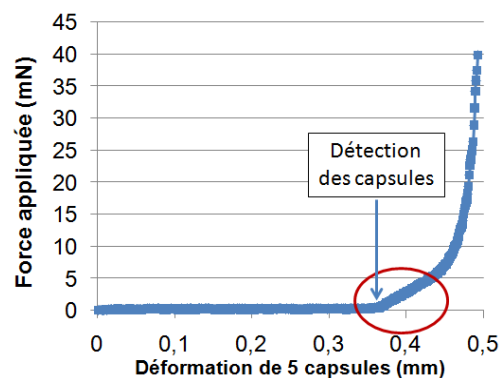


Figure 63 – Courbe de force compression effectuée sur 5 billes de diamètre  $\leq 200$  µm.

Pour avoir une idée de la précision de l'appareil, les tests sont d'abord réalisés sur des billes de 1mm de diamètre, réalisées avec une gélification externe et avec un temps de contact dans le bain de gélification d'au moins 2 jours. 5 tests de compression sont réalisés sur une seule bille. La variabilité trouvée sur le module d'Young est de 9,9% et la variabilité de la taille détectée est de 3%.

Le même test a été réalisé sur des capsules de  $\leq 200$  µm, mais le seuil de détection de l'appareil ne permet pas de détecter une seule capsule. Il est nécessaire de comprimer plusieurs capsules pour avoir une courbe exploitable. Afin de bien calibrer la mesure, les billes sont aspirées à la pipette (visualisation par le



## Chapitre II – Matériel et méthodes

microscope) et précisément comptées. Le module trouvé est alors divisé par le nombre de capsules écrasées.

Des premiers tests ont été réalisés afin d'évaluer le nombre de capsules nécessaires à une mesure fiable. 5 capsules, 10 capsules ou 20 capsules, stockées en bain externe de gélification (pendant plus de 2 jours), sont écrasées et les modules d'Young ainsi que les écarts-type des mesures sont calculés. Pour chaque condition, 10 tests de compression sont réalisés.

Les résultats de cette étude sont présentés sur le graphique Figure 64. La taille détectée à  $97 \mu\text{m} \pm 2\%$ . Les modules obtenus pour un écrasement de 10 capsules et 5 capsules sont similaires ( $\sim 1700 \text{ kPa}$ ) ainsi que leur écart-type. En revanche pour 20 capsules, le module obtenu diminue. La sonde d'une surface de  $28 \text{ mm}^2$  n'est pas assez grande pour comprimer autant de billes. Certaines billes glissent en dehors de la zone de compression, expliquant la baisse du module d'Young obtenu.

Dans la suite, les caractérisations sont réalisées sur 5 capsules pour les essais sur les capsules les plus rigides (restées en bain de calcium à  $100 \text{ mM}$  pendant plus de 2 jours) et 10 capsules pour les capsules stockées dans le sérum physiologique avec une concentration plus faible en calcium de  $2 \text{ mM}$ .

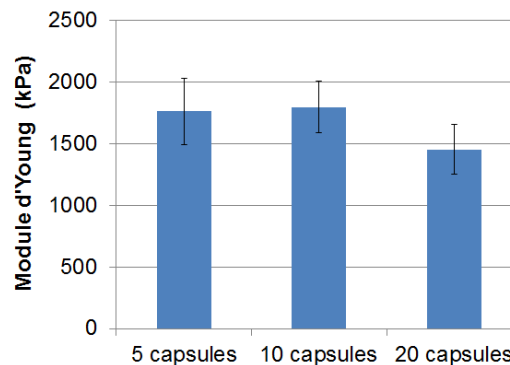


Figure 64 - Comparaison du module obtenu en fonction du nombre de billes comprimées.

### II.4.3.3. PERTINENCE DE LA FORMULE D'HERTZ

Les capsules en gélification externe ont un diamètre détecté de  $97 \mu\text{m} \pm 2\%$ , alors que la partie sphérique des capsules mesurée au microscope à un diamètre de  $123 \mu\text{m} \pm 3\%$ . Lorsque l'appareil détecte les capsules, il y a donc eu a priori déjà  $21\%$  de déformation. Cela voudrait dire qu'avec  $20\%$  de déformation supplémentaire, la formule est alors appliquée pour une déformation de près de  $40\%$ .

Cependant, en traçant les courbes de  $\delta^{1.5}$  en fonction de la force appliquée, les  $20\%$  de déformation considérés sont correctement approximés par une droite. Pour les capsules avec une résistance forte (dans le bain gélifiant) ou faible (sérum physiologique), les coefficients de détermination des droites  $R^2$  sont  $\geq 0,8$ . De plus, l'équipe de Yan *et al.* reporte que la formule d'Hertz peut être valable pour des déformations supérieures à  $20\%$  pour certains matériaux [276]. Nous considérons donc que pour les déformations des capsules d'alginate, la formule d'Hertz est valable.

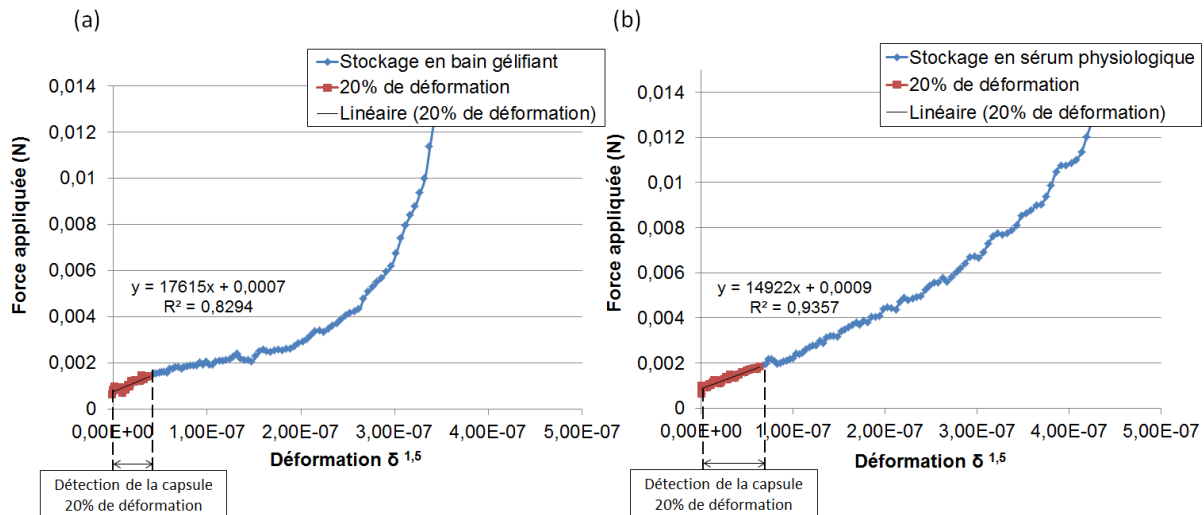


Figure 65 – Evolution de la force appliquée en fonction de  $\delta^{1,5}$ , a) 5 capsules gélifiées en externe puis conservées en bain gélifiant, b) 10 capsules gélifiées en externe puis conservées en sérum physiologique.

#### II.4.3.4. NORMALISATION DES VALEURS PAR LA TAILLE DES CAPSULES

Les capsules réalisées par différents procédés de gélification n'ont pas forcément la même taille (notamment pour la gélification en bain externe, où les capsules ont une forme de larme). Pour pouvoir les comparer, une normalisation des modules par la taille est réalisée. Le module d'Young en  $\text{N/m}^2$  est multiplié par le rayon des capsules détecté par l'appareil et est alors exprimé en  $\text{N/m}$ . Par exemple, pour les valeurs présentées sur le graphique précédent, la normalisation donne des valeurs de l'ordre de 80  $\text{N/m}$ .

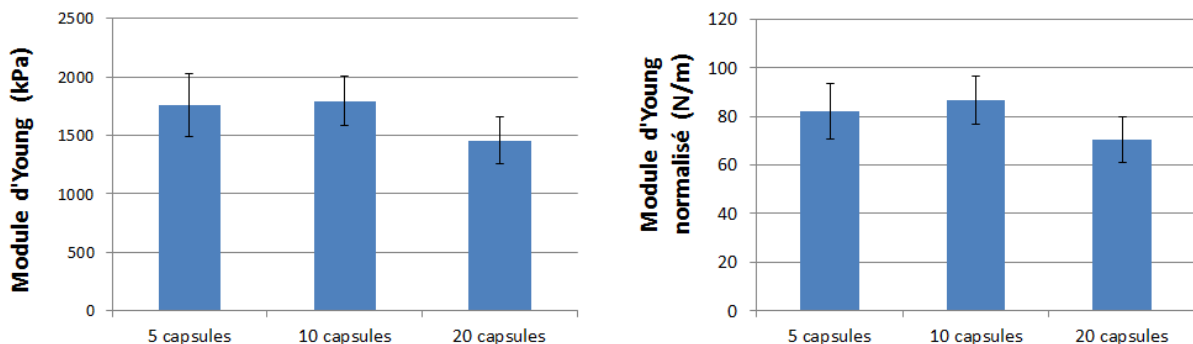


Figure 66 – Normalisation des modules d'Young ( $\text{N/m}$ ) par la taille détectée par l'appareil.



---

### III - OPTIMISATION DE LA PRE- GELIFICATION

---



## Chapitre III – Optimisation de la pré-gélification

Le but de ce troisième chapitre est de définir une méthode de gélification pouvant être par la suite automatisée dans la carte fluidique.

Les premières encapsulations réalisées en microsystème consistent à transposer le protocole d'encapsulation des systèmes classiques macroscopiques sur une puce microfluidique [215][214][277]. La principale différence est que le fluide porteur est de l'huile et non de l'air. Nous avons commencé par tester ce procédé (Figure 67-a). Il a l'avantage de se dérouler à pH physiologique, mais donne des capsules en forme de larme, ce qui n'est pas optimal du point de vue de la biocompatibilité. Cette forme est due à une déformation de la goutte lors de son transfert de la phase huileuse vers la phase aqueuse. Ces résultats, développés en première partie de ce chapitre, ont été une base pour les études suivantes.

Pour obtenir des capsules sphériques, le principe utilisé a déjà été indiqué dans la thèse de S. Le Vot. Il consiste à débiter la gélification des capsules dans le canal de sortie en flux d'huile, étape que nous appelons pré-gélification, puis à finir cette gélification en bain externe de calcium. Cela permet de limiter le temps de potentielle anoxie des cellules dans l'huile [79]. Cette méthode repose sur la méthode de gélification dans l'huile développée par l'équipe de Zhang et al. [223]. Des cristaux d'acétate de calcium sont utilisés pour gélifier les capsules dans le flux d'huile (Figure 67-b). Cependant, les capsules sont récupérées en bain d'huile, ce qui requiert de nombreuses étapes de lavages afin d'enlever toute trace d'huile avant implantation. Le couplage entre les deux procédés de pré-gélification dans l'huile et de gélification en bain externe a deux avantages : l'obtention de capsules sphériques directement en phase aqueuse et la limitation du temps de contact des cellules avec l'huile (Figure 67-c).

Ce chapitre décrit les travaux réalisés pour optimiser le procédé de pré-gélification en microsystème. La mise au point de ce procédé porte sur trois aspects :

- Le procédé de préparation de l'agent pré-gélifiant (acétate de calcium)
- La concentration de l'agent pré-gélifiant
- Le temps de contact de l'agent pré-gélifiant avec la goutte d'alginate dans le canal de sortie de la puce.

Les optimisations effectuées seront évaluées au fur et à mesure suivant trois critères : la forme des capsules, la toxicité cellulaire et la résistance mécanique.

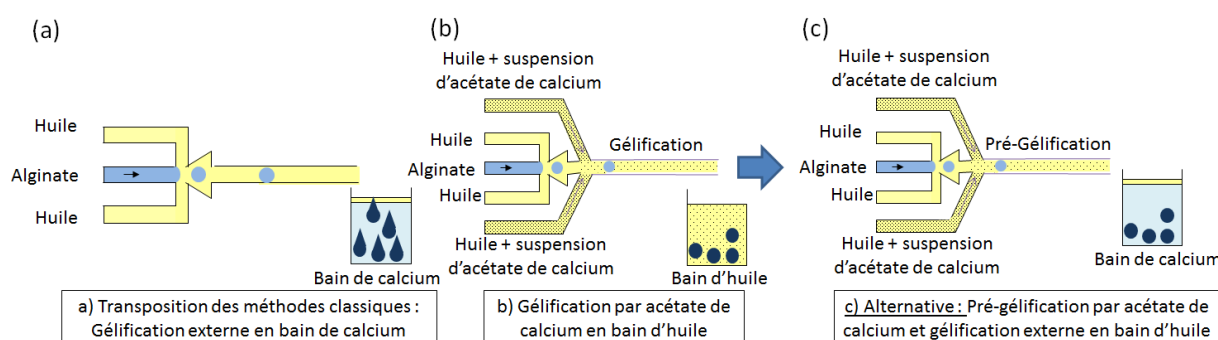


Figure 67 - Procédés de gélification en microsystème.

### III.1 ETUDE DE LA GELIFICATION EN BAIN EXTERNE

Avant de commencer à travailler sur l'optimisation du procédé d'encapsulation, l'objectif a été valider le procédé d'encapsulation en microsysteme avec une gélification en bain externe de calcium. Des études de viabilité de cellules après encapsulation en microsysteme sont donc menées et comparées aux résultats des méthodes classiques macroscopiques d'encapsulation. Cette étude a permis de valider le protocole d'encapsulation en microsysteme et donne une base de comparaison essentielle pour les études sur la pré-gélification.

#### III.1.1 Etude de la gélification externe en microsysteme

L'équivalent des techniques d'encapsulation macroscopiques en microsysteme est la production d'une émulsion par des systèmes à jonction-T ou dans notre cas MFFD [278][214] présentés dans le paragraphe I.3.2.2.2 (Figure 68-a). L'émulsion monodisperse formée et contrôlée en pression [185][279], évolue dans le canal de sortie puis tombe dans un bain de calcium externe au microsysteme où les gouttes gélifient les unes après les autres.

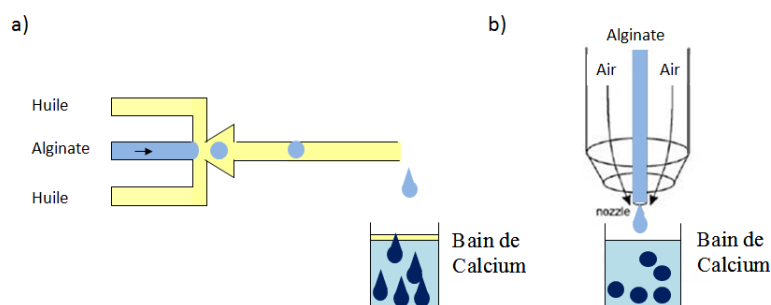


Figure 68 - Représentation schématique de la gélification externe (a) Par microsysteme (b) Par méthode classique de dripping.

Les pressions utilisées sont  $P_{\text{huile}} = P_{\text{alginate}} = 350$  mbar. Comme dans la littérature, cette gélification externe induit la formation de capsules avec une forme allongée « en larme » (Figure 69) [215][231]. Cette déformation est due au passage des gouttes au travers de la couche d'huile formée au fur et à mesure du fonctionnement du système au-dessus du bain de calcium. Les paramètres de circularité pour ces formes de larmes sont approximativement de  $c=0,61$  ( $\pm 9\%$ ) et  $r=1,54$  ( $\pm 6\%$ ). Le coefficient de polydispersité est importante à plus de 20%. Cette disparité est causée par un taux de coalescence important des gouttes non gélifiées dans le film d'huile avant leur passage en bain de calcium.

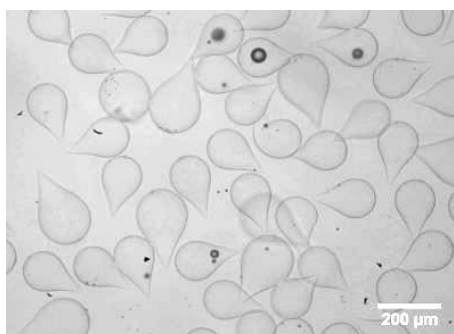


Figure 69 - Capsules obtenues par gélification en microsysteme en bain externe de calcium.

## Chapitre III – Optimisation de la pré-gélification

Le problème de déformation des gouttes lors de leur passage d'interface se retrouve également dans les systèmes classiques [280], mais le phénomène est moindre et peut être contourné par des conditions expérimentales précises (distance de collecte, viscosité de l'alginate et tension interfaciale) permettant de former des capsules sphériques [137]. La couche d'huile présente au-dessus du bain de calcium pour le procédé en microsysteme rend l'optimisation plus difficile.

La simple production de gouttes en microsysteme puis la gélification en bain externe ne peut en rien concurrencer les méthodes classiques macroscopiques (à cause notamment du problème de forme). Cependant, comme indiqué, cette première étude est une base de comparaison pour l'optimisation du procédé de pré-gélification. L'évaluation de la gélification externe en microsysteme se poursuit donc en termes d'impact sur la viabilité des cellules encapsulées.

### III.1.1.1. PROCEDE D'ENCAPSULATION EXTERNE ET INFLUENCE SUR LA VIABILITE CELLULAIRE

#### III.1.1.1.1. *Les lignées testées*

L'étude est menée sur trois types de cellules présentés dans le chapitre II.2.1. Le modèle cellulaire le plus rapide à prendre en main et à tester est la lignée des Jurkat (cellules lymphocytaires humaines). Puis, le procédé d'encapsulation est testé sur le modèle mRIN5-F (cellules pancréatiques de rat) sous forme de pseudo-îlots. C'est le modèle trouvé le plus proche des îlots de Langerhans de par sa capacité à former des amas de cellules. Enfin, le procédé externe a pu être testé sur des îlots humains en provenance de l'EFS lors d'une expérience.

Dans cette étude, l'influence du procédé d'encapsulation a été mesurée avec des tests de viabilité pour les lignées Jurkat et mRIN5-F. En revanche sur les îlots humains, des tests de fonctionnalité (sécrétion d'insuline) ont pu être également réalisés.

#### III.1.1.1.2. *Protocole d'encapsulation*

Pour ces expériences de gélification externe, différentes concentrations d'alginate ont été utilisées en fonction des lignées. Pour les cellules Jurkat, la concentration est de 3% (w/v), concentration fixée pour l'ensemble des expériences fluidiques et d'encapsulation, reportées dans la suite du manuscrit. Par contre, dans un souci de comparaison avec les méthodes de gélification classiques réalisées en macrosystèmes, l'encapsulation des pseudo-îlots et des îlots pancréatiques humains a été réalisée avec une concentration d'alginate de 2% (w/v) [88][281]. Le protocole de préparation des solutions et des cellules avant encapsulation est décrit au chapitre II.3.3. La concentration cellulaire finale pour l'encapsulation est d'environ  $2 \times 10^7$  cellules/ml pour les cellules Jurkat,  $2 \times 10^4$  îlots/ml pour les pseudo-îlots. La concentration d'îlots humains dépend du nombre d'îlots fourni par l'hôpital. Pour ce test, 20 000 IEQ soit environ 4500 îlots de tailles différentes à un indice de pureté de 90% ont été reçus et encapsulés. 10% des îlots sont conservés comme témoins, la concentration finale est de  $8 \times 10^3$  îlots/ml d'alginate.

Les microsystemes sont choisis en fonction de leur profondeur pour adapter au mieux la taille des capsules à la taille des cellules à encapsuler (Figure 70) [237]. Pour l'encapsulation des Jurkat et des pseudo-îlots des dispositifs de profondeur 200  $\mu\text{m}$  sont utilisés. Pour l'encapsulation des îlots humains, ce sont des dispositifs de 500  $\mu\text{m}$ . Les îlots humains sont polydisperses de 50  $\mu\text{m}$  jusqu'à parfois plus de 500  $\mu\text{m}$ . Les dispositifs de 500  $\mu\text{m}$  permettent d'encapsuler les îlots de toutes les tailles. Pour cette expérience, aucun tri préalable en taille n'a été effectué afin d'avoir le maximum d'îlots à étudier.



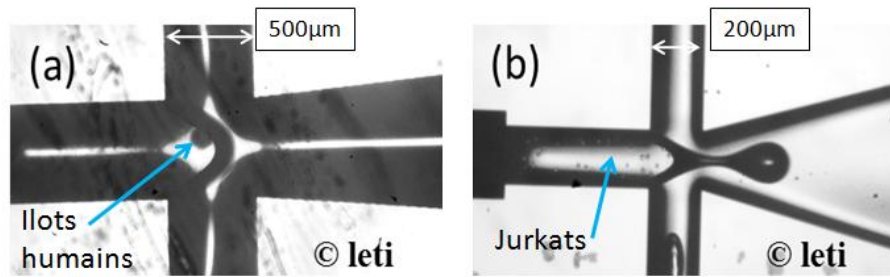


Figure 70 - Encapsulation de cellules en microsysteme (a) Encapsulation d'îlots de Langerhans humains, (b) Encapsulation de cellules Jurkat.

Le procédé d'encapsulation dure entre 1 et 2h. Les dispositifs de 200 µm fonctionnent à une fréquence d'environ 80 gouttes/minute tandis que ceux de 500 µm fonctionnent à fréquence réduite à 15 gouttes/minute. Les capsules sont laissées environ 10 minutes dans le tampon de gélification avant d'être lavées dans leur milieu de culture respectif à trois reprises puis remises en culture à l'incubateur.

### III.1.1.1.3. Résultats d'encapsulation

Les cellules témoins et les cellules encapsulées associées sont illustrées sur la Figure 71. Pour les cellules Jurkat, la concentration cellulaire au sein d'une capsule est d'environ 30 cellules/capsule. Pour les deux autres types cellulaires, les statistiques d'encapsulation sont indiquées dans ce même tableau : nombre de capsules vides, de capsules avec un îlot ou plus et le nombre de protrusions. Pour les deux encapsulations d'îlots, le nombre de capsules vides est important et est un problème pour l'implantation [282]. Pour diminuer le nombre de capsules vides, il est possible d'augmenter la concentration en îlots dans l'alginate. L'étape d'homogénéisation est alors cruciale au risque de voir augmenter la proportion de capsules avec plus d'un îlot. Dans le cas des pseudo-îlots, le pourcentage de protrusion est assez important, mais la taille des capsules ne semble pas adaptée à celle des îlots, un tri en taille préalable aurait dû être effectué.

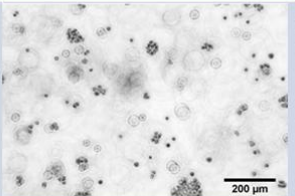
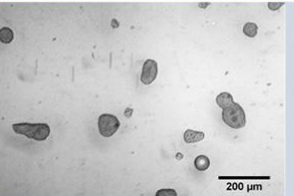
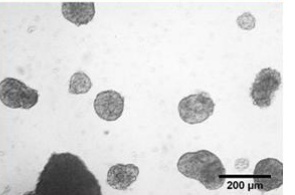

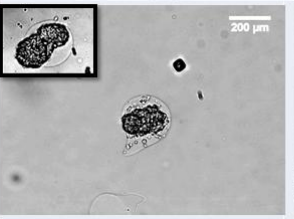
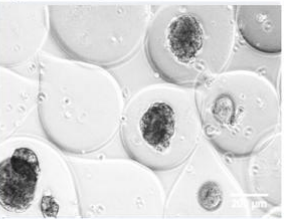
Lignée cellulaire	Jurkat	Pseudo-îlots	Îlots de Langerhans
Avant encapsulation			
Après encapsulation			
% de capsules vides		45%	55%
% de capsules avec un îlot		36%	36%
% de capsules avec plus d'un îlot		19%	9%
% de protrusion		13%	<1%

Figure 71 - Cellules avant et après le procédé d'encapsulation et statistiques de l'encapsulation.

## Chapitre III – Optimisation de la pré-gélification

L'influence du procédé d'encapsulation sur la viabilité des cellules est mesurée sur une période de 2 jours pour les Jurkat, 3 jours pour les pseudo-îlots et 10 jours pour les îlots humains. Pour les Jurkat, ce choix est fonction du temps de doublement de la lignée et donne l'influence de l'encapsulation sur une génération de cellules. Pour les autres cellules, les temps choisis donnent, à notre avis, une bonne idée de l'influence du procédé sur la viabilité des cellules. Le taux de viabilité obtenu est comparé à celui des cellules témoins laissées dans incubateur. L'expérience est réalisée à deux reprises pour les cellules Jurkat et les pseudo-îlots et à une reprise pour les îlots humains. La viabilité est analysée par coloration au bleu de trypan pour les Jurkat et par fluorescence (intercalant : iodure de propidium et diacétate de fluorescéine) pour les pseudo-îlots et les îlots humains selon le protocole décrit en partie II.2.1.2 et II.2.1.3 (Figure 73-b).

### ❖ Lignées Jurkat et pseudo-îlots

L'évolution de la viabilité après le procédé d'encapsulation pour les types cellulaires Jurkat et pseudo-îlots est représentée sur la Figure 72. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-type entre les deux expériences. Pour les cellules Jurkat, la viabilité est déterminée par capsule puis la moyenne sur une trentaine de capsules donne la viabilité de l'échantillon. Concernant les pseudo-îlots, nous rappelons que les îlots sont classés suivant le nombre de cellules vivantes au sein de l'amas. Si plus de 50% des cellules sont vivantes, l'îlot est considéré comme viable (critère CHU Grenoble). Les tests sont réalisés sur une cinquantaine d'îlots témoins et sur une vingtaine d'îlots encapsulés par jour.

Deux jours après encapsulation, la perte de viabilité pour les Jurkat est de l'ordre de 5% ( $\pm 1\%$ ). Trois jours après encapsulation, la viabilité est équivalente entre pseudo-îlots témoins et pseudo-îlots encapsulés.

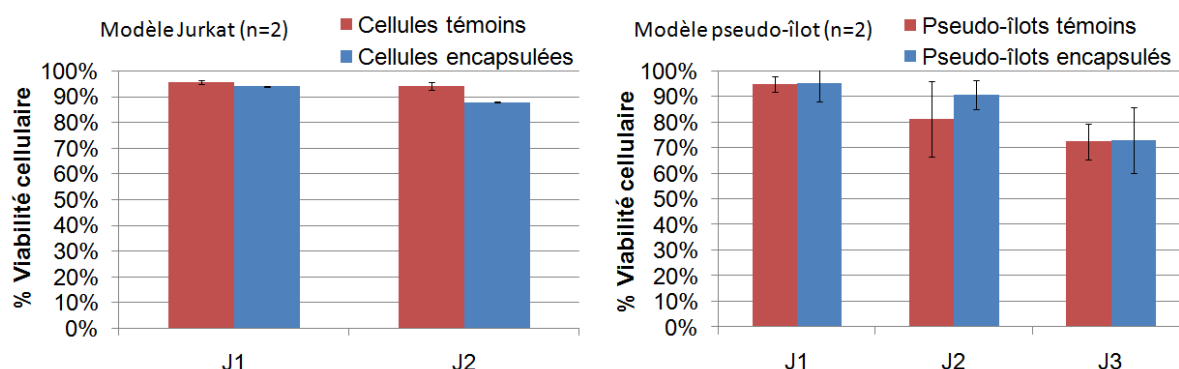


Figure 72 - Evolution de la viabilité des cellules Jurkat et mRin5-F après encapsulation.

### ❖ Îlots pancréatiques humains

Concernant les îlots humains, les résultats ont été présentés à Amboise au Workshop of Bioencapsulation 2011 (annexe 3). La viabilité a été étudiée sur une dizaine de jours. 45 îlots encapsulés et non encapsulés ont été analysés par jour. Le graphe Figure 73 représente l'évolution de la viabilité en fonction du temps en comparaison aux îlots non encapsulés.

Aucune toxicité du procédé d'encapsulation en bain externe sur les îlots humains n'est visible. En remarque, les îlots encapsulés restent sous forme d'amas pendant plus de dix jours tandis que les îlots témoins se désagrègent après 4 jours de culture. La structure de la capsule d'alginate aide à la conservation des îlots, phénomène connu et référencé [283][284].

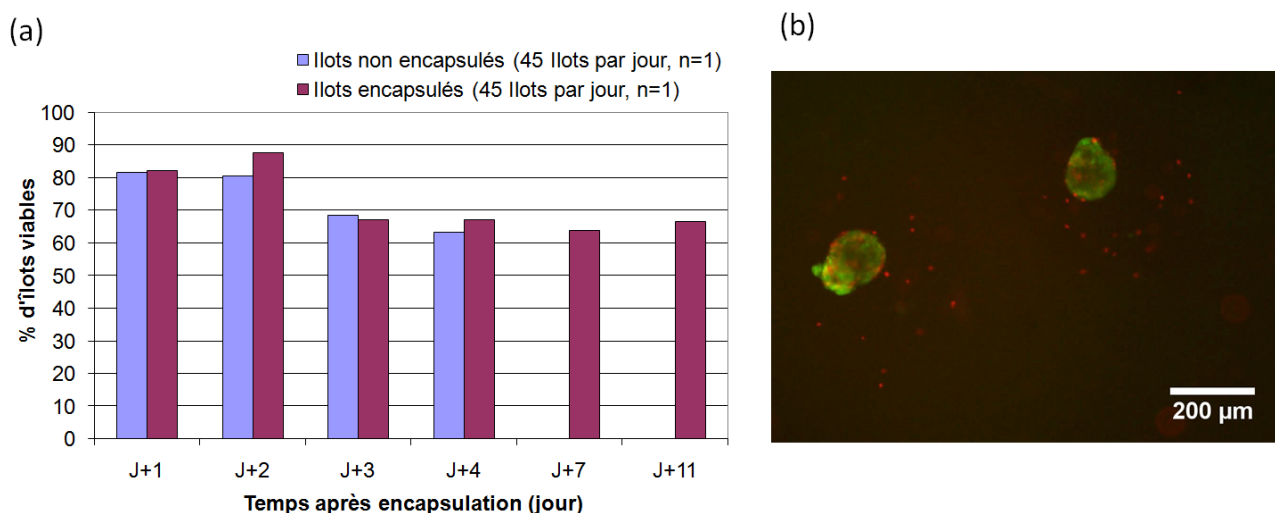


Figure 73- a) Evolution de la viabilité en fonction du temps pour les îlots de Langerhans encapsulés, b) Test de viabilité sur les îlots encapsulés.

La fonctionnalité des îlots après encapsulation a été évaluée par un test d'insulino-sécrétion (ELISA – kit Mercodia). La mesure d'absorbance est réalisée avec l'appareil de chez Tecan (Infinite M1000). Le test est réalisé pour les îlots témoins et les îlots encapsulés sur 2 heures de sécrétion pour deux concentrations de glucose. LGS désigne la stimulation basale à 0,8 g/L de glucose et HGS la sécrétion à concentration élevée en glucose à 4 g/L. Les sécrétions ont pu être évaluées sur 3 jours après encapsulation des îlots (Figure 74). Le test a été réalisé sur 3 lots de 10 îlots encapsulés et non encapsulés, la barre d'erreur représente l'écart-type entre ces lots. L'expérience a pu être réalisée une fois.

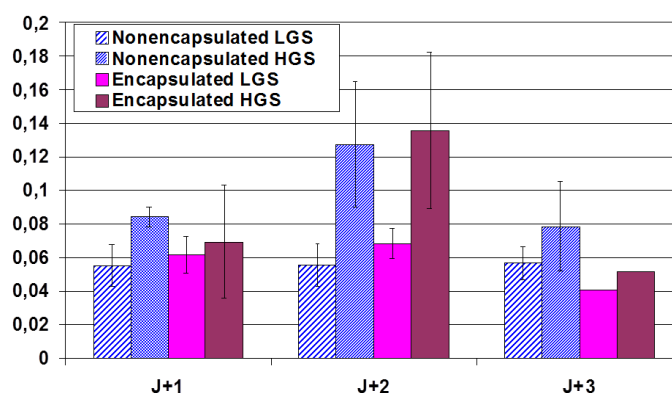


Figure 74 - Sécrétion d'insuline des îlots encapsulés et des îlots témoins pendant trois jours après encapsulation.

Les sécrétions sont normalisées par la sécrétion totale d'insuline extraite par un mélange Ethanol/HCl (extraction pendant une nuit à 4°C). Cela permet de s'affranchir de la différence de sécrétion entre des îlots de taille différente. Pour les îlots témoins, tout comme pour les îlots encapsulés, de l'insuline est sécrétée pour les deux concentrations de glucose. La quantité d'insuline détectée est plus importante pour la plus haute concentration de glucose. Cependant, la variabilité des valeurs est très importante. Cette première expérience assure que les îlots sont encore fonctionnels, mais la quantité d'insuline sécrétée ne peut pas être interprétée. Le faible nombre d'îlots restants ne nous a pas permis de reconduire l'expérience.

Aucune toxicité n'a été observée après encapsulation avec le protocole de gélification externe réalisé en microsystème. Trois lignées ont été testées dont les îlots pancréatiques humains. Les résultats de viabilité obtenus sont similaires à ceux des systèmes classiques d'encapsulation macroscopiques. Les protocoles de préparation et de stérilisation des puces, de préparation des solutions et d'encapsulation

ont donc été validés. Les résultats suivants avec l'étape de pré-gélification seront comparés à ce résultat de gélification externe.

### III.1.2 Enjeu de la pré-gélification

---

L'encapsulation externe par microsystème donne de bons résultats en matière de viabilité, mais les formes des capsules ne sont pas satisfaisantes dans la perspective d'une implantation. Tout l'enjeu est de développer un procédé non toxique permettant d'obtenir des capsules sphériques en sortie de microsystème.

Pour cela, nous avons développé la méthode dite de pré-gélification. Le but est de rigidifier juste assez les gouttes dans le flux d'huile pour empêcher qu'elles ne se déforment en traversant l'interface huile/calcium. Nous retrouvons cette idée dans une étude de l'équipe de Zimmermann en système macroscopique où un jet de cristaux de  $\text{BaCl}_2$  initie la gélification des gouttes, avant qu'elles ne tombent dans un bain gélifiant de baryum [63]. En microsystème, la difficulté est de trouver comment et sous quelle forme re-suspendre une forme de calcium dans de l'huile. Le protocole développé utilise de l'acétate de calcium, comme les travaux de Zhang et al [223].

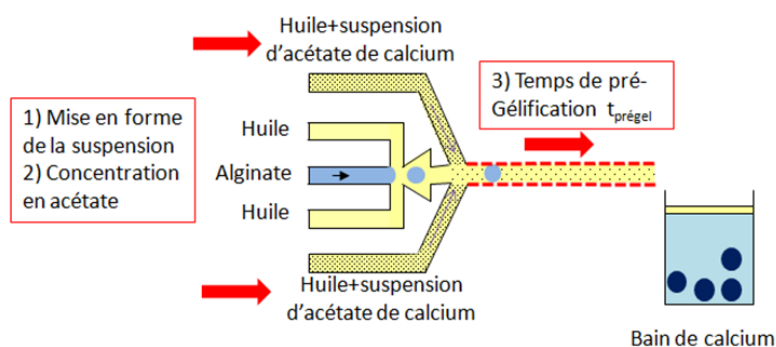
Pendant toute cette étude, le pourcentage d'alginate utilisé est de 3% (w/v). A la suite du MFFD simple sont ajoutés deux canaux supplémentaires 500  $\mu\text{m}$  après le lieu de formation de l'émulsion, qui injectent la suspension huileuse de cristaux d'acétate de calcium. Les pressions utilisées sont  $P_{\text{huile}}=P_{\text{acétate}}=P_{\text{alginate}}=350 \text{ mbar}$ .

L'optimisation de cette pré-gélification est l'objet de ce chapitre, elle porte sur plusieurs paramètres représentés sur la Figure 75 :

- 1) La mise en forme des cristaux d'acétate de calcium dans la phase huileuse.
- 2) La concentration de la suspension d'acétate de calcium dans l'huile.
- 3) Le temps de contact entre les cristaux et les gouttes d'alginate noté  $t_{\text{prégel}}$ . Ce temps peut être ajusté en faisant varier la longueur de la connectique de sortie du microsystème. Pour une intégration en microsystème, la limite est fixée à 1 min.

L'impact de ces trois paramètres sera étudié sur l'homogénéité de surface, la sphéricité, la viabilité cellulaire et la résistance mécanique des capsules. Les influences attendues a priori et qui seront vérifiées sont indiquées dans le tableau (Figure 75).

Le but est de développer un procédé pouvant pré-gélifier les gouttes rapidement et avec une concentration d'acétate de calcium faible. Il est en effet probable que l'acétate de calcium soit toxique à exposition importante ou prolongée.



	Homogénéité	Sphéricité	Viabilité	Résistance mécanique
1) Mise en forme des cristaux	+	+		
2) Concentration d'acétate de calcium		+	+	+
3) Temps de pré-gélification		+	+	+

Figure 75 - Pré-gélification par acétate de calcium et gélification en bain de calcium des capsules.

### III.2 MISE EN FORME DES CRISTAUX D'ACETATE DE CALCIUM DANS LA PHASE HUILEUSE

La pré-gélification sert à rigidifier les capsules avant leur gélification finale en bain externe de calcium. Dans cette partie, trois mises en forme de la suspension d'acétate de calcium sont testées et optimisées en concentration et en temps de pré-gélification (1min et 30s). Les critères d'évaluation sont les suivants : le pourcentage de capsules en forme de larme, la sphéricité des capsules et l'homogénéité de la première couche d'alginate gélifiée, car c'est l'interface qui sera exposée au système immunitaire du patient. Il a été démontré que la présence de rugosités importantes sur la capsule induisait des réactions immunitaires [2][37].

#### III.2.1 Les cristaux d'acétate de calcium

Pour préparer la solution d'acétate de calcium, la contrainte principale est l'écoulement de cette suspension dans des canaux de 200  $\mu\text{m}$  de profondeur. Les données du fournisseur donnent la répartition en taille des cristaux d'acétate de calcium selon le graphique Figure 76 (Macco Organiques). 98% des cristaux ont une taille supérieure à 75  $\mu\text{m}$  et près de 20% supérieure à 200  $\mu\text{m}$ .

**Sans préparation supplémentaire, avec une simple mise en suspension dans l'huile, les cristaux d'acétate bouchent rapidement la puce.**

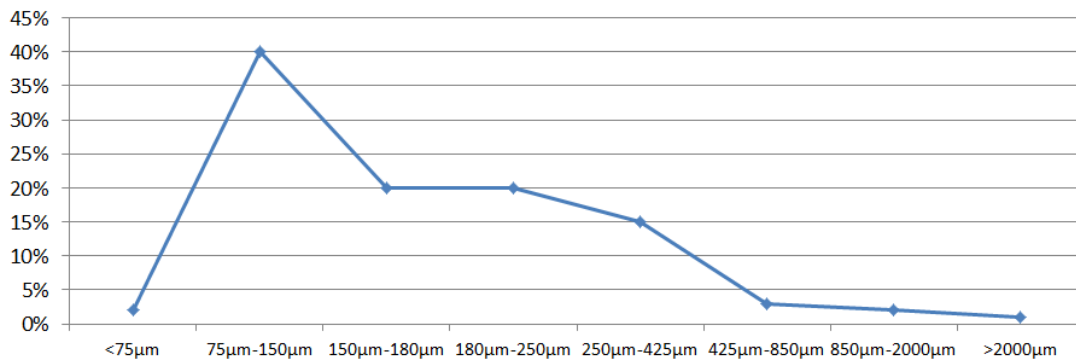


Figure 76 - Répartition initiale des cristaux d'acétate de calcium (données du fournisseur).

Il faut donc trouver une méthode de préparation de la suspension permettant de réduire la taille des cristaux injectés. Deux méthodes principales sont testées. Le tri des cristaux par sédimentation pour sélectionner les cristaux les plus fins. Le problème est que pour cette méthode la concentration finale en calcium est difficile à évaluer. Le broyage des cristaux pour réduire la taille moyenne des cristaux en suspension. La taille des cristaux sera évaluée pour les deux méthodes par diffusion dynamique de la lumière (Zetasizer Nano ZS de chez Malvern Instruments).

### III.2.2 Méthodes de préparation de la suspension d'acétate de calcium

#### III.2.2.1. METHODE DE TRI DES CRISTAUX PAR SEDIMENTATION (PROCEDE 0)

Le premier procédé testé est le tri par sédimentation des cristaux dans l'huile. L'huile utilisée est de l'huile de soja (raffinée, Ph. Eur. Carl Roth). La concentration initiale est de 4% (w/w), la solution est testée sans sédimentation puis avec un temps de sédimentation de 1h et de 4h (noté S0h, S1h, S4h). Le surnageant est prélevé et utilisé comme fluide porteur gélifiant dans la puce. La concentration en acétate de calcium pour chaque solution est respectivement évaluée à 4%, 3,4% ( $\pm 0,3\%$ ), 1,4% ( $\pm 0,08\%$ ).

Cette évaluation est réalisée à deux reprises de la façon suivante, les différents surnageants ont été centrifugés et le culot de cristaux récupéré a été lavé trois fois par du dichlorométhane afin d'éliminer l'huile. Le dichlorométhane a ensuite été évacué par évaporation et les cristaux récupérés ont été pesés.

Les abréviations du type 1,4%\_t<sub>pré-gel</sub>1min utilisées dans ce paragraphe désignent par exemple une concentration de 1,4% (w/w) (correspondant à un temps de sédimentation de 4h) et un temps de pré-gélification de 1min.

La Figure 77 montre que plus t<sub>pré-gel</sub> est long, plus le nombre de larmes est réduit pour tous les échantillons et plus le temps de sédimentation est long, plus le pourcentage de larmes augmente. Pour l'échantillon S4h, 1 min de pré-gélification n'est pas suffisant, puisque le taux de larmes s'élève encore à 21%. L'échantillon S0h est un cas particulier, car les canaux se bloquent rapidement empêchant finalement le flux de s'écouler et la pré-gélification. Le pourcentage de larmes est donc anormalement important pour 30 s de pré-gélification mais est pratiquement nul en 1 min. La présence de larmes est fonction de la concentration en calcium (réduit en fonction du temps de sédimentation) et du temps de contact avec la goutte d'alginate t<sub>pré-gel</sub>.

Les différents temps de sédimentation influencent également la sphéricité et l'homogénéité de surface des capsules obtenues. Les images des capsules obtenues pour t<sub>pré-gel</sub> = 1min ainsi que les graphiques des paramètres de sphéricité pour t<sub>pré-gel</sub> = 1min et 30s sont présentés Figure 78. 50 capsules sont évaluées par condition en fonction des critères de sphéricité (circularité et ratio, pour les définitions se reporter au



## Chapitre III – Optimisation de la pré-gélification

II.4.1). Afin de se concentrer sur la sphéricité et l'homogénéité des capsules, les larmes ne sont pas prises en compte pour ces mesures de sphéricité.

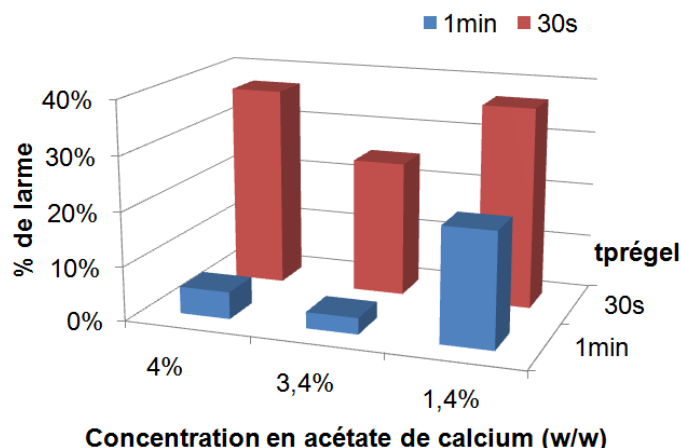
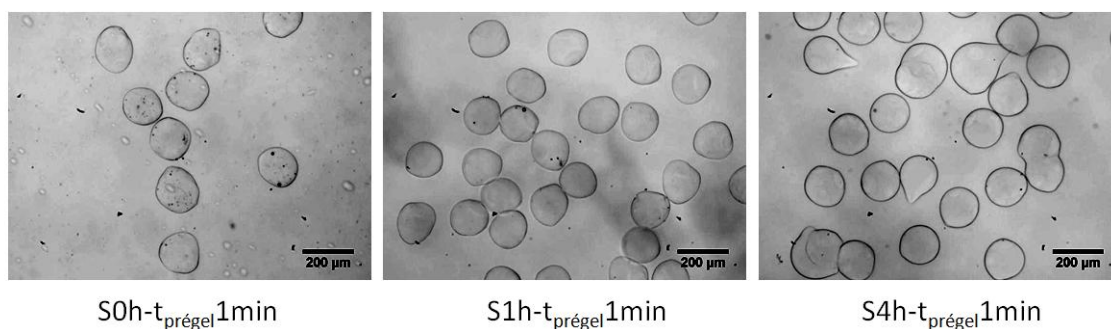


Figure 77 - Pourcentage de larmes en fonction de la concentration en acétate de calcium.

(a)



(b)

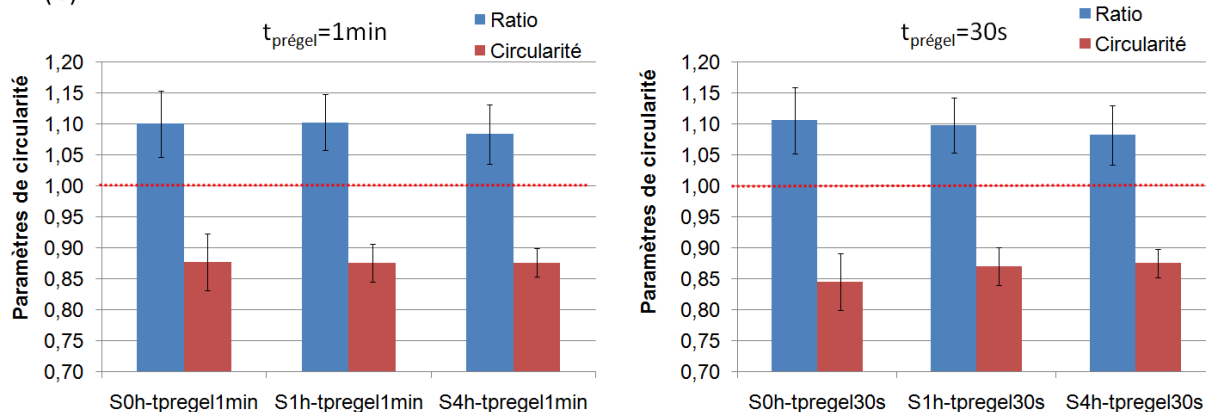


Figure 78 - a) Capsules obtenues pour  $t_{\text{pré-gel}}=1\text{min}$  pour les trois temps de sédimentation b) Paramètres de sphéricité  $t_{\text{pré-gel}}$  de 1min et de 30s pour les trois temps de sédimentation.

Plus le temps de sédimentation est important, plus les cristaux restants pour la pré-gélification, sont fins. Ce tri a un impact positif sur la sphéricité des capsules obtenues (Figure 78-a). Sur les images Figure 78 (a), les capsules, qui ne sont pas en forme de larme, sont visiblement sphériques pour une sédimentation de 4h, alors qu'elles paraissent « cabossées » pour des temps de sédimentation plus courts. Les résultats graphiques sont moins évidents, mais il apparaît tout de même une amélioration. Pour le temps de sédimentation de 4h, les valeurs sont plus proches de 1 et les écarts-type sont plus faibles (Figure 78-b).

## Chapitre III – Optimisation de la pré-gélification

Pour ce procédé, les conditions qui donnent les capsules les plus sphériques sont 1,4%\_t<sub>pré-gel</sub>30s et 1,4%\_t<sub>pré-gel</sub>1min avec  $c = 0,88 (\pm 2,62\%)$  et  $r = 1,08 (\pm 4,4\%)$ . Cependant, pour ces conditions, les pourcentages de larmes sont respectivement égaux à 37% et 21%.

La dispersion en taille des cristaux présents en solution a été mesurée au zetasizer (Figure 79). La taille moyenne est de 1,3  $\mu\text{m}$  ( $\pm 4,8\%$ ).

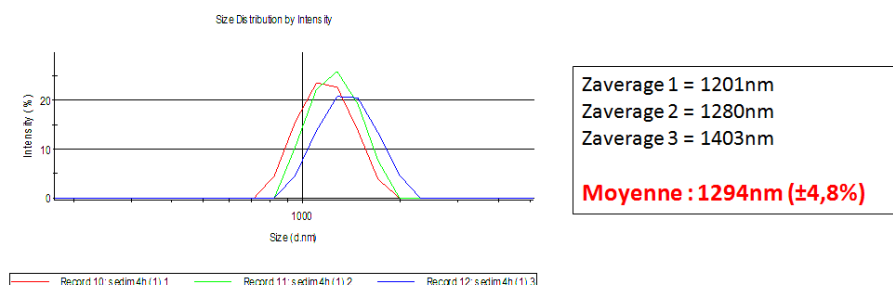


Figure 79 – Distribution en taille des cristaux d'acétate de calcium après un temps de sédimentation de 4h.

Des cristaux plus fins donnent des capsules plus sphériques. Cependant, la concentration en acétate de calcium n'est pas suffisante pour une pré-gélification de 30 s ou même de 1 min (le taux de larmes est trop important). Concentrer les cristaux de petite taille avec cette méthode de sédimentation, implique l'utilisation d'une quantité très importante d'acétate de calcium (cf. la distribution en taille des cristaux Figure 76). Cela a été réalisé et requiert pour une pré-gélification de 30s sans forme de larme d'utiliser 10 g de cristaux d'acétate de calcium trié par sédimentation puis concentré au fur et à mesure dans 10ml d'huile.

**Ce procédé de préparation des cristaux n'est pas acceptable car aucune des conditions ne satisfait les deux critères : un nombre de larmes faible et des capsules sphériques. La solution est de trouver une méthode de broyage de ces cristaux pour augmenter la concentration en cristaux fins de ces suspensions.**

### III.2.2.2. METHODE DE PREPARATION PAR BROUAGE ULTRASONS DES CRISTAUX (PROCEDE 1)

Une autre solution envisagée au cours de ce projet est le broyage des cristaux par ultrasons. La concentration initiale de la suspension de cristaux dans l'huile de soja (raffinée, Ph. Eur. Carl Roth) est la même égale à 4% (w/w). Une sonde de 3 mm VCX500W Ultrasonic processor (cf. II.3.1.2) est plongée pendant 15 min à une puissance de 125W dans la suspension huileuse de cristaux. Puis, une étape de sédimentation de 2h est réalisée, afin d'éliminer les plus gros cristaux non broyés. Le surnageant est ensuite prélevé puis à nouveau exposé aux ultrasons pendant 15 min à la même puissance. La dispersion en taille des cristaux est obtenue par le zetasizer sur la Figure 80. La taille moyenne est de 2  $\mu\text{m}$  ( $\pm 3,4\%$ ).

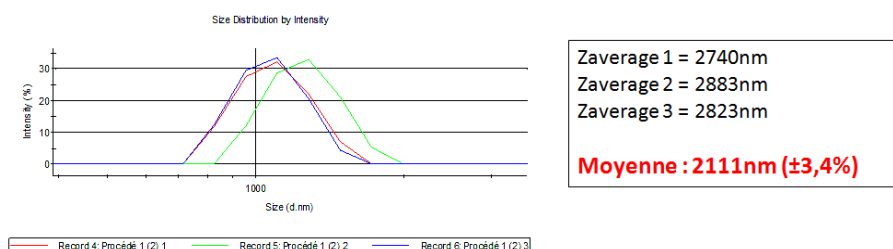


Figure 80 – Répartition de la taille des cristaux après broyage aux ultrasons.

La concentration de la solution finale est évaluée, suivant le même protocole que précédemment (séchage par dichlorométhane), à 2,8% (w/w) ( $\pm 0,15\%$ ). Cette solution est diluée par 4 puis par 8 pour baisser la concentration en acétate de calcium, soit à 0,70% (w/w) et 0,35%(w/w).



## Chapitre III – Optimisation de la pré-gélification

Les solutions sont d'abord évaluées comme pour le procédé précédent en fonction du pourcentage de larmes obtenu pour les temps de pré-gélification de 1 min et de 30 s. La répartition est présentée sur le graphique Figure 81. Le nombre de larmes est négligeable pour  $t_{\text{prégel}}$  de 1 min et augmente légèrement pour 30 s. Cependant, le pourcentage reste inférieur à 10%.

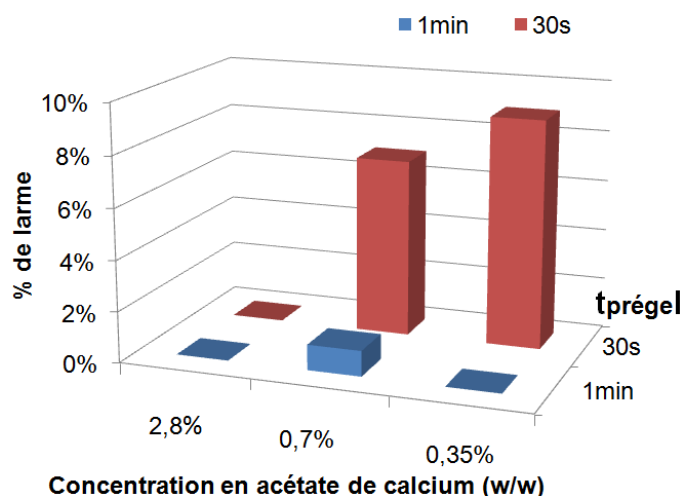


Figure 81 - Pourcentage de larmes pour le broyage par ultrasons et après différentes dilutions.

La circularité des capsules est évaluée pour le plus faible temps de pré-gélification soit 30 s pour les trois concentrations. Les capsules sont représentées Figure 82 et les paramètres de sphéricité sont indiqués dans le graphique Figure 83.

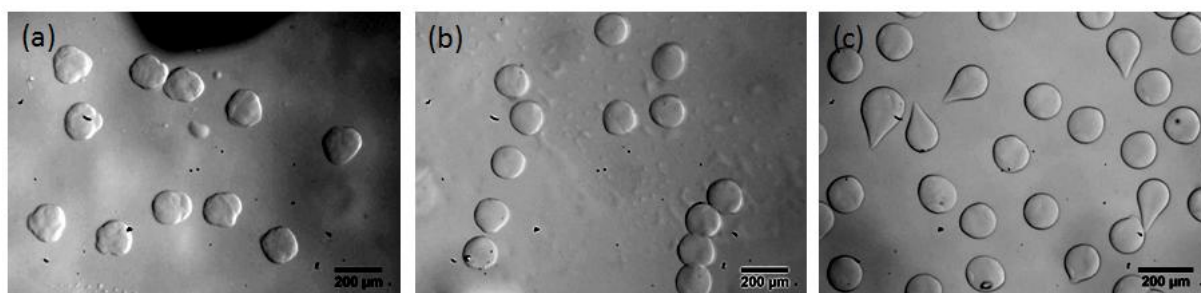


Figure 82 - Aspect des capsules pré-gélifiées par acétate de calcium à une concentration de (a) 2,8% (w/w), (b) 0,70% (w/w), (c) 0,35% (w/w).

Plus la concentration utilisée est importante, plus les capsules apparaissent cabossées. L'hypothèse est peut être que l'impact des cristaux sur la surface de la goutte donne une surface inhomogène et boursouflée. En réduisant la concentration, le nombre d'impact est réduit et les capsules récupérées deviennent de plus en plus lisses et sphériques (Figure 82-b et c). Les meilleurs paramètres sont obtenus pour une concentration de 0,35% (w/w), les paramètres de sphéricité sont de  $c=0,88 (\pm 2,1\%)$  et un  $r= 1,08 (\pm 5\%)$ . Le coefficient de polydispersité de ce lot de capsules est de 5,1%. En augmentant le temps de pré-gélification à 1min, le pourcentage de larme obtenu est nul mais les indices de sphéricité se dégradent  $c=0,85 (\pm 3,4\%)$  et  $r=1,097 (\pm 5\%)$ . La meilleure condition, correspondant à une concentration de 0,35% (w/w) avec  $t_{\text{prégel}}=30\text{s}$ , est donc conservée pour la suite de l'étude.

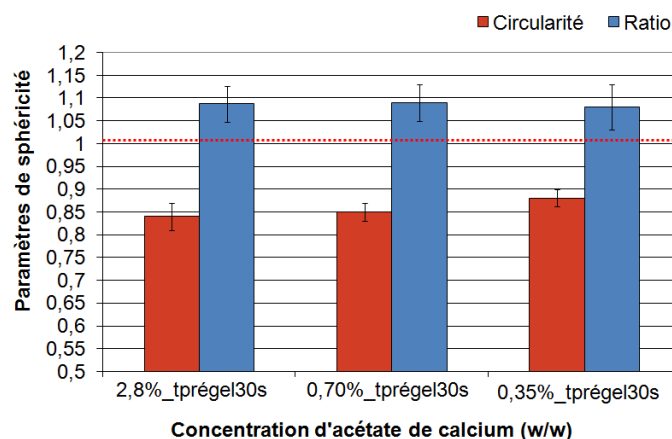


Figure 83 - Evolution des paramètres de sphéricité en fonction de la concentration en acétate de calcium.

### III.2.2.3. METHODE DE PREPARATION (PROCEDE 2)

**Confidentiel**

### III.2.3 Bilan comparatif

#### III.2.3.1. ANALYSE COMPARATIVE EN TAILLE DES CRISTAUX

Au cours de cette étude, il a été démontré que la taille des cristaux en suspension a une influence importante sur l'aspect final des capsules. Des caractérisations en diffusion dynamique de la lumière ont été réalisées afin d'avoir une idée de la taille des cristaux en suspension. Les graphiques de dispersion en taille sont rappelés en Figure 84.

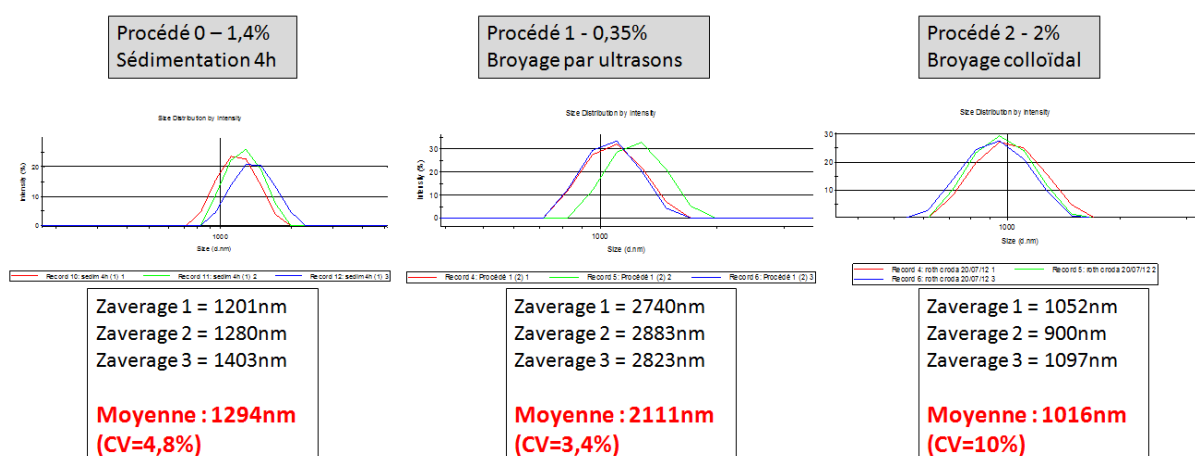


Figure 84 - Analyse de la taille des cristaux pour les différents procédés de pré-gélification.

Le broyage par ultrasons est efficace puisque comparé à la distribution initiale, la taille des cristaux a été nettement réduite. Néanmoins, les cristaux restent plus gros que les cristaux restants après une sédimentation de 4h, eux-mêmes plus gros que les cristaux obtenus par broyage colloïdal. Le broyage colloïdal permet d'obtenir des cristaux dans l'ensemble plus fins par rapport aux deux autres procédés et donne des capsules plus sphériques.

## Chapitre III – Optimisation de la pré-gélification

Connaissant la taille des cristaux et la concentration de chaque préparation, les temps de pré-gélification nécessaires pour avoir un pourcentage de larmes nul sont indiqués dans le tableau Figure 85.

Procédé	Procédé 0 – 1,4%	Procédé 1 – 0,35%	Procédé 2 – 2%
Taille moyenne	1294nm	2111nm	1016nm
Temps de pré-gélification	>1min	30s	30s

Figure 85 – Relation entre la concentration en acétate de calcium, les tailles des cristaux, et  $t_{\text{pré-gel}}$ .

De ce tableau, nous déduisons que, plus la taille des cristaux est grande, plus la concentration nécessaire à un temps de pré-gélification de 30s est faible.

**Avec des cristaux plus fins, il faut donc augmenter la concentration ou le temps de pré-gélification pour éviter l'apparition de forme de larme.**

### III.2.3.2. BILAN SUR LA SPHERICITE

La taille des cristaux a un impact sur la sphéricité des capsules. Cependant, la concentration et le temps de pré-gélification jouent également un rôle primordial, puisque s'ils sont trop faibles, ils induisent la formation de larme. Le graphique Figure 86 compare les différentes techniques testées et optimisées pour un temps de pré-gélification de 30s: la sédimentation de 4h, donnant une concentration de 1,4%(w/w), le broyage par ultrasons avec une concentration de 0,35% (w/w) et le broyage colloïdal avec une concentration de 2% (w/w). Un temps inférieur de pré-gélification ( $t_{\text{pré-gel}}=10\text{s}$ ) donne un pourcentage de plus de 70% de larme pour chacune des méthodes présentées, ce qui n'est pas acceptable.

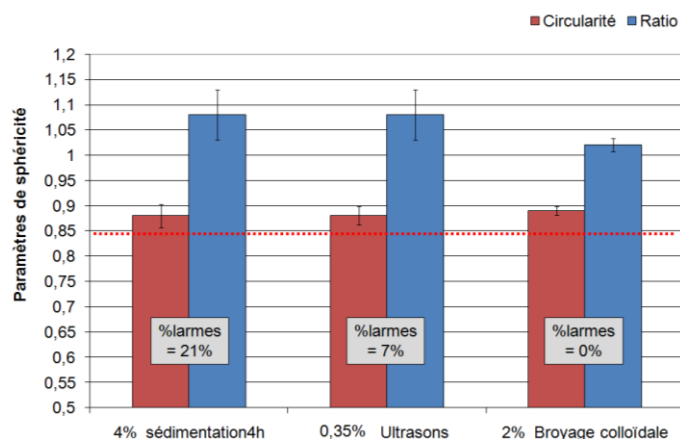


Figure 86 - Bilan comparatif des différents procédés de préparation pour l'acétate de calcium.

Le procédé de sédimentation de 4h et le procédé 1 présentent des indices de circularité similaires. Cependant, le taux de larmes pour le procédé de sédimentation est plus de deux fois plus élevé que pour le procédé 1. Un pourcentage de larme de 7% est raisonnable pour le système.

La différence de circularité entre le procédé 2 et les deux autres procédés est importante, les capsules obtenues ont des indices de sphéricité plus proches de 1 avec de faibles écarts-type. La méthode de broyage colloïdal est la méthode la plus efficace pour obtenir des capsules sphériques, monodisperses et homogènes. Le critère sphéricité indique comme choix le procédé 2. Cependant, la concentration en acétate de calcium utilisée pour ce procédé est beaucoup plus importante. Le choix entre les procédés 1 et 2 reste donc à confirmer en fonction de l'impact de la concentration sur la viabilité cellulaire.

## Chapitre III – Optimisation de la pré-gélification

Les deux dernières méthodes, procédé 1 et procédé 2 avec les concentrations respectives de 0,35% (w/w) et 2% (w/w) en acétate de calcium sont retenues. Cependant, la méthode de broyage colloïdal est la méthode qui permet d'obtenir les capsules les plus sphériques.

### III.2.3.3. ASPECT DE SURFACE DES CAPSULES

Cependant, la pré-gélification par cristaux d'acétate de calcium a un impact visible sur la surface des capsules produites. Les capsules présentent une rugosité de surface importante. Les images Figure 87 sont prises avec un microscope (Olympus IX51) pour les deux procédés choisis. Les aspérités visibles sont très certainement dues aux impacts des cristaux d'acétate sur les capsules au moment de la pré-gélification, elles dépendent vraisemblablement de la taille des cristaux. Les impacts visibles sur les capsules issues du procédé 1 sont plus gros que ceux sur les capsules issues du procédé 2.

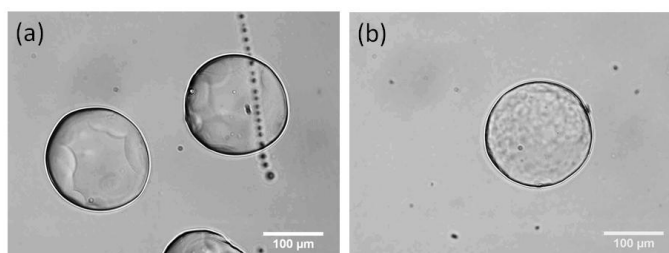


Figure 87 - Aspect de surface des capsules a) 0,35% (w/w) par ultrasons, b) 2% (w/w) par broyage colloïdal.

La pré-gélification par cristaux d'acétate de calcium n'est pas une solution durable pour la gélification des capsules car la surface obtenue n'est pas homogène. D'autres alternatives doivent être trouvées. Cependant, ce procédé permet de pouvoir démontrer le fonctionnement du système automatisé dans de bonnes conditions, soit avec la production de capsules sphériques et monodisperses.

### III.2.4 Autres méthodes testées et perspectives

Une autre méthode de gélification dans l'huile existe et peut être adaptée en pré-gélification. L'équipe de Kim *et al.* utilise [224][225] de l'acide oléique contenant du  $\text{CaCl}_2$  en suspension. Le protocole indiqué dans leur publication a été reproduit. Le principe est de dissoudre du  $\text{CaCl}_2$  dans du 2-méthyl-1-propanol, puis de le mélanger à de l'acide oléique 50% (v/v). L'alcool est ensuite distillé afin de récupérer une solution d'acide oléique avec le calcium en suspension. Un dépôt de calcium se forme en fond de ballon, la solution récupérée est filtrée à 0,2  $\mu\text{m}$ . Il est donc difficile avec ce protocole d'évaluer la concentration en calcium de la suspension finale.

La différence entre ce procédé et les autres procédés présentés est que le calcium n'est plus sous forme de cristaux mais sous forme dissoute. Pour un temps de pré-gélification de 30s (0% de larme) et même de 10s (10% de larmes), les capsules obtenues sont sphériques et ne présentent pas de rugosité de surface (Figure 88). Pour une pré-gélification de 30s, les coefficients de sphéricité sont  $c=0,88 (\pm 1\%)$  et  $r=1,06 (\pm 2\%)$ . Sur ce premier essai, les paramètres semblent légèrement moins bons que ceux de l'acétate broyé 2% (w/w) mais la surface des capsules réalisées par ce procédé semble beaucoup plus lisse.

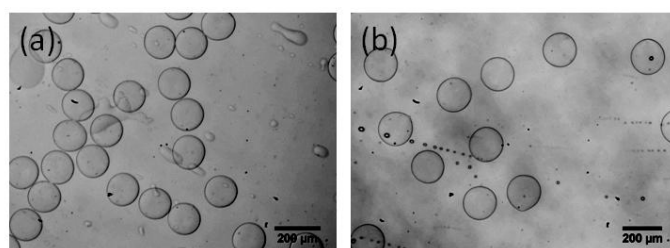


Figure 88 - Capsules pré-gélifiées par de l'acide oléique a)  $t_{\text{prégel}}=30\text{s}$ , b)  $t_{\text{prégel}}=10\text{s}$ .

L'équipe qui travaille sur ce procédé a relevé une importante toxicité de cette suspension sur les cellules encapsulées, dépendant du temps de contact entre l'acide oléique et les capsules [224]. Cette méthode peut être cependant une bonne alternative sur un temps très court ( $\leq 10\text{s}$ ) où l'impact sur la viabilité des cellules serait plus faible. Cela est d'autant plus vrai que dans le module de transfert de phase, l'acide oléique serait intégralement évacué après les 10s de pré-gélification.

L'autre problème majeur de cette méthode est le dépôt progressif d'une couche de cristaux à la surface des canaux, ce qui bouche la puce au fur et à mesure de son utilisation. Ce problème n'est pas répertorié dans l'état de l'art et n'est pas observé pour les cristaux d'acétate de calcium. L'acide oléique ne peut donc être utilisé tel quel et demande des investigations supplémentaires, que nous avons décidé de ne pas mener dans le cadre de cette thèse (Figure 89).

Pollution du canal de sortie

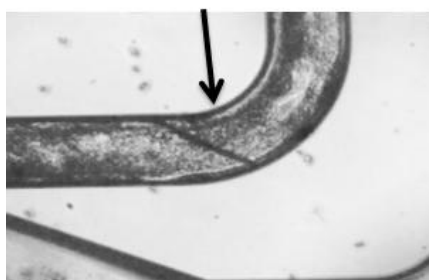


Figure 89 - Pollution du canal de sortie par des dépôts de calcium.

### III.3 IMPACT DES PROCÉDES SUR LA VIABILITÉ CELLULAIRE

Dans ce chapitre, il s'agit de déterminer l'influence sur la viabilité cellulaire des procédés de pré-gélification mis au point dans la partie III.2.2, ainsi que la résistance mécanique des capsules produites.

L'influence de la concentration en acétate de calcium sur la viabilité cellulaire a été mesurée pour deux concentrations du procédé 1 : 0,70% (w/w) et 0,35% (w/w). Le procédé 2 a été optimisé plus tard et n'a pas été testé sur ce dispositif à un étage. En revanche, des tests mécaniques ont bien pu être réalisés pour les différents procédés.

#### III.3.1 Impact sur la viabilité cellulaire

L'influence de la pré-gélification sur la viabilité des cellules encapsulées est évaluée par comparaison à la gélification externe simple en bain de calcium (III-1.1.2).

Lors du fonctionnement du microsystème, un film d'huile concentré en cristaux d'acétate de calcium se forme au-dessus du bain externe de gélification. Comparé au procédé de gélification externe, les cellules sont exposées aux cristaux d'acétate de calcium pendant la somme des temps : de pré-gélification  $t_{\text{prégel}}$  (fixé à 30s cf. III.2.2), de transfert en bain aqueux  $t_{\text{transfert}}$  (variant entre 10 et 20s) et de gélification en bain externe de calcium  $t_{\text{gel}}$  (Figure 90). A noter que pour l'étude en gélification externe simple,  $t_{\text{gel}}$  avait été fixé à 10 min et aucune influence sur la viabilité n'avait été observée.

L'ensemble des paramètres à étudier est résumé sur le schéma Figure 90. Il s'agit d'une part de la concentration en acétate de calcium et d'autre part du temps d'exposition total ( $t_{\text{prégel}} + t_{\text{transfert}} + t_{\text{gel}}$ ) aux cristaux d'acétate de calcium. Les temps de gélification  $t_{\text{gel}}$  testés sont de 1 min, 10 min et 20 min.

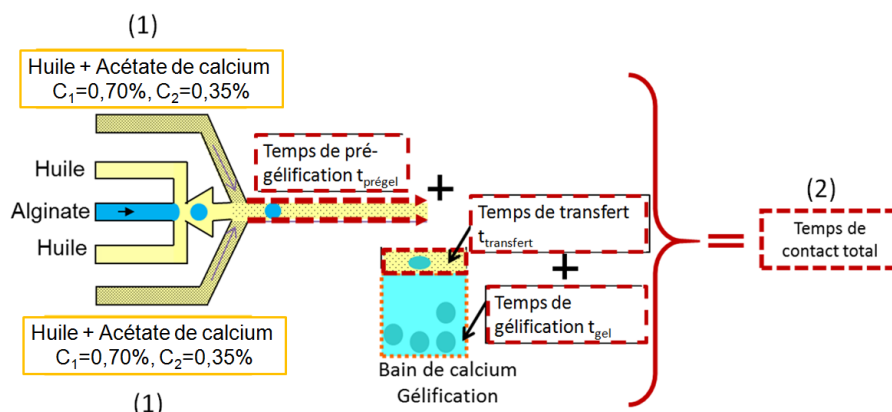


Figure 90 - Schéma des différents paramètres de la pré-gélification étudiés (1) Impact de la concentration en acétate de calcium, (2) Impact du temps de contact avec l'acétate de calcium.

Après le procédé d'encapsulation et avant de remettre les cellules en incubateur, un procédé de lavage est nécessaire. Ce procédé manuel est détaillé sur le schéma Figure 91. Les capsules obtenues après les différents temps de gélification sont centrifugées ( $t=1$  min à 6000 rpm), le surnageant composé d'huile et des cristaux enlevé et remplacé par du milieu de culture. Trois lavages successifs sont effectués afin de réduire les résidus d'huile et d'abaisser au maximum la concentration résiduelle en calcium.

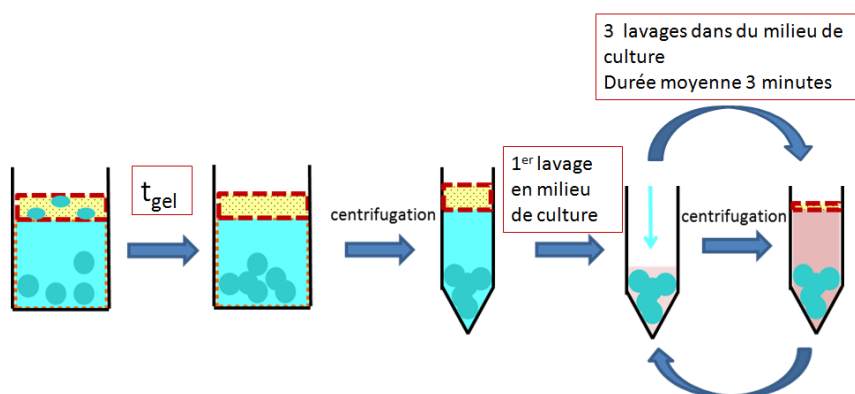


Figure 91 - Schéma de lavage des capsules avant remise en culture des cellules

Ce protocole de gélification n'est pas reproductible ni d'une capsule à l'autre, ni d'une expérience à l'autre. D'une part, les temps de gélification indiqués sont une moyenne pour le lot de capsule considéré. Par exemple, pour un temps de gélification de 1 min, les capsules récupérées sont produites pendant 30s par le microsystème, puis l'ensemble du lot continue la gélification pendant  $\sim 45s$  supplémentaires avant d'être lavées. Il y a alors 30s de gélification d'écart entre les premières et les dernières capsules produites. D'autre part, le protocole de lavage manuel et sa durée (estimée à 3 min) n'est pas négligeable surtout pour un temps de gélification de 1 min.

**Ce manque d'homogénéité inter-capsules et inter-expériences est à prendre en compte lors de l'analyse des résultats.**

### III.3.1.1. IMPACT DE LA CONCENTRATION EN AGENT GELIFIANT

L'influence de la concentration en acétate de calcium sur la viabilité cellulaire est étudiée pour des conditions expérimentales  $t_{prégel} = 30s$  et  $t_{gel} = 10$  min. Le procédé utilisé pour tester l'impact de la concentration est le procédé 1 (broyage par ultrasons) avec les concentrations  $C_1=0,70\%$  et  $C_2=0,35\%$ . Les

## Chapitre III – Optimisation de la pré-gélification

résultats présentés sont la moyenne de trois expériences, avec pour chaque jour d'étude une analyse d'une trentaine de capsules avec une concentration cellulaire moyenne de 30 à 60 cellules/capsule.

Les capsules récupérées présentent des traces d'huile importantes (Figure 92). La présence de trace d'huile était moins visible en l'absence de cellules. De plus, la forme des capsules obtenues est nettement moins sphérique que la forme obtenue lors de l'optimisation des procédés de pré-gélification III.2.3. Les capsules, finalement conservées dans du milieu de culture cellulaire, sans ion calcium, subissent un gonflement osmotique considérable (~40%). Les capsules gonflent et se déforment de façon importante (Figure 92). Ces images prises 10 min et 1 h après suspension en milieu cellulaire illustrent bien ce phénomène.

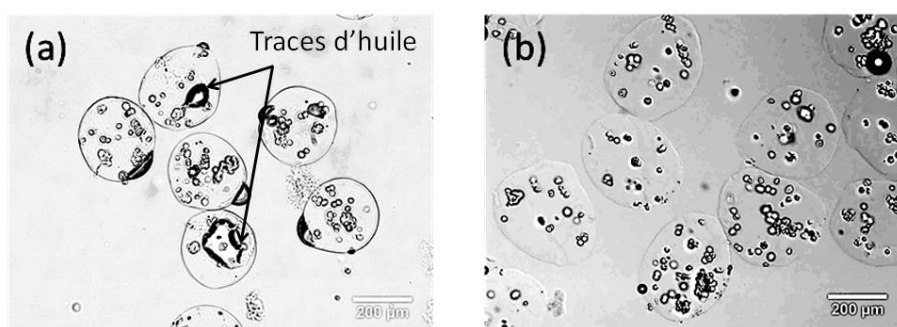


Figure 92 - Encapsulation de cellules pour la condition  $t_{\text{prégel}}=30\text{s}$ ,  $t_{\text{gel}}=10\text{min}$  pour la concentration  $C_2$ , a) Après 10 min de mise en culture, b) Après une heure de mise en culture

Malgré les formes obtenues, les capsules n'ont pas éclatées et la viabilité cellulaire est évaluée sur deux jours après encapsulation. Les résultats sont présentés sur la Figure 93. Les barres d'erreur représentent les écarts-type entre les différentes expériences.

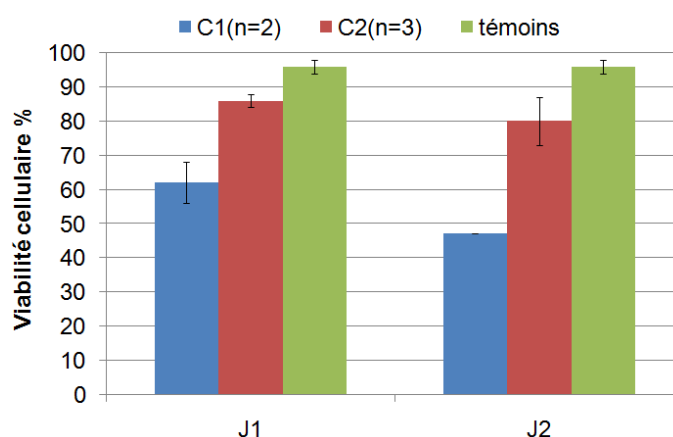


Figure 93 - Evolution de la viabilité cellulaire sur deux jours après encapsulation en fonction de la concentration en acétate de calcium,  $C_1=0,70\%$  (w/w),  $C_2=0,35\%$  (w/w).

Pour la condition  $t_{\text{prégel}}=30\text{s}$  et  $t_{\text{gel}}=10\text{min}$ , la concentration en acétate de calcium a un impact non négligeable sur la viabilité cellulaire. L'effet est visible dès le premier jour après encapsulation où la viabilité chute de  $34\pm5\%$  pour  $0,70\%$  (w/w) et seulement de  $10\pm2\%$  pour la concentration la plus basse  $0,35\%$  (w/w). Après deux jours, la concentration  $0,70\%$  (w/w) présente une baisse de viabilité de près de  $50\pm1\%$  et la concentration  $0,35\%$  (w/w) de  $15\pm7\%$ . Même si cela n'a pas été testé, nous pouvons donc supposer qu'une concentration de  $2\%$  (procédé 2) aurait induit une toxicité encore plus importante.

La présence de l'agent pré-gélifiant « acétate de calcium » induit une toxicité du procédé d'encapsulation. Pour la concentration la plus basse considérée  $0,35\%$  (w/w), la baisse de viabilité au bout du deuxième jour



## Chapitre III – Optimisation de la pré-gélification

est de  $14 \pm 7\%$  alors qu'elle n'était que de  $5 \pm 1\%$  pour les mêmes conditions de gélification pour la gélification en bain externe (III-1).

**Une concentration en acétate de calcium la plus basse possible est donc préférable pour limiter la toxicité du procédé sur les cellules encapsulées.**

### III.3.1.2. IMPACT DU TEMPS DE GELIFICATION

C'est la concentration 0,35% (w/w) qui impacte le moins la viabilité cellulaire, elle est donc conservée pour la suite des études. Pour un temps de pré-gélification de 30s, la viabilité cellulaire est évaluée pour différents temps de gélification :  $t_{gel}=1$  min, 10 min et 30 min. Comme précédemment, pour chaque temps de gélification, l'expérience est réalisée à trois reprises, pour trente capsules avec une concentration cellulaire moyenne de 30 cellules/capsules. L'évolution de la viabilité en fonction du temps de gélification est représentée sur la Figure 94. Les témoins sont respectivement à  $96 \pm 1\%$  à J1 et à  $95 \pm 1\%$  à J2.

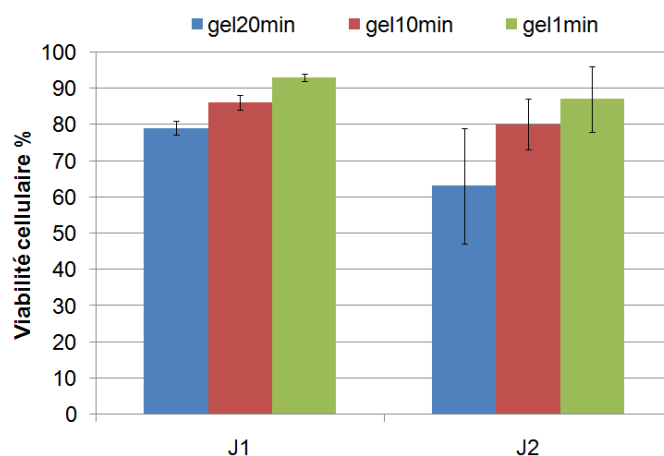


Figure 94 - Impact du temps de gélification sur la viabilité cellulaire

D'après ces résultats, le temps de gélification  $t_{gel}$  a une influence sur la viabilité cellulaire. La perte de viabilité est croissante en fonction de  $t_{gel}$ . Après deux jours, elle est de  $34 \pm 17\%$  pour  $t_{gel}=20$ min,  $15 \pm 5\%$  pour  $t_{gel}=10$ min et de  $7 \pm 7\%$  pour  $t_{gel}=1$ min.

Le bilan de la toxicité en fonction du temps d'exposition à l'acétate de calcium est reporté Figure 95. Comme illustré sur le schéma global de pré-gélification (Figure 90), cette toxicité trouvée prend en compte un temps de pré-gélification  $t_{prégel}$  de 30s, un temps de transfert  $t_{transfert}$  de 10 à 20s et le temps de gélification  $t_{gel}$ . Les deux temps  $t_{prégel}$  et  $t_{transfert}$  sont communs pour les différents temps de gélification testés. Ils sont négligeables comparé aux temps de gélification de 20 et 10 min. En revanche, ils ne sont pas négligeables pour  $t_{gel}=1$ min. Or c'est la condition qui donne les meilleurs résultats de viabilité. Nous en avons déduit que l'influence des temps  $t_{prégel}$  et  $t_{transfert}$  est négligeable par rapport à celle induite par le temps de gélification  $t_{gel}$ .

$t_{total} = t_{prégel} + t_{transfert} + t_{gel}$	Toxicité
$= t_{prégel} + t_{transfert} + t_{gel} = 2\text{min}$	-
$\sim t_{gel} = 10\text{min}$	+
$\sim t_{gel} = 20\text{min}$	++

Figure 95 – Bilan de la toxicité en fonction du temps d'exposition à l'acétate de calcium.



## Chapitre III – Optimisation de la pré-gélification

La gélification externe de 10 min en bain de calcium sans présence d'acétate de calcium n'induisait pas de mortalité cellulaire (III-1.1.2). Cette expérience de gélification en bain externe sans agent de pré-gélification est reconduite pour les différents temps de pré-gélification de 1 min, 10 min et 20 min, afin de s'assurer que ce temps n'influence pas la viabilité cellulaire. La longueur de tygon en sortie de puce est gardée identique à l'expérience précédente, afin d'avoir un temps de présence dans l'huile similaire. Les résultats sont présentés sur le graphique Figure 96.

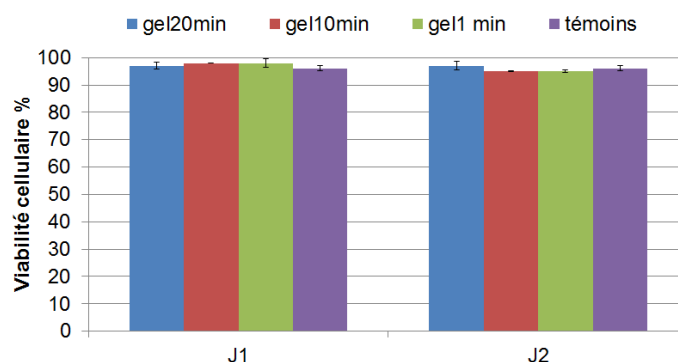


Figure 96 - Impact du  $t_{gel}$  pour une gélification en bain externe classique.

L'influence d'un temps de passage dans l'huile de 30s et d'un temps de gélification jusqu'à 20min sans acétate de calcium est nulle pour ce modèle cellulaire. La toxicité identifiée précédemment (Figure 94) provient donc bien de la présence d'un film d'huile chargé en acétate de calcium à la surface du bain de gélification, qui devient alors toxique pour les cellules encapsulées.

Il se peut que l'acétate de calcium présent dans l'huile soit progressivement dissout dans le bain de calcium occasionnant, soit un changement de pH, soit une augmentation de la concentration en calcium. Le pH de la solution a été contrôlé et ne change pas, ce qui paraît cohérent étant donné que le milieu utilisé est tamponné (10 mM Hepes). Les bains de gélification des capsules après 1 min, 10 min et 20 min de gélification sont récupérés et une mesure de la concentration de calcium est réalisée par une électrode commerciale (Metrohm Ca<sup>++</sup>). Le tableau Figure 97 donne les valeurs obtenues pour une concentration de 0,70% (w/w) (procédé 1).

C1=0,70% (w/w) / $t_{gel}$	1min	10min	20min
Concentration initiale en calcium	100mM	100mM	100mM
Concentration finale en calcium (mesurée)	~100mM	~107mM	~116mM

Figure 97 – Evolution de la concentration de calcium dans le bain gélifiant, en fonction du temps de gélification.

**C'est donc l'augmentation de la concentration en calcium qui semble être responsable de la toxicité induite par le temps de gélification.**

Dans ces expériences, l'influence de l'acétate de calcium a été évaluée sur un temps d'exposition important (1 min, 10 min et 20 min). Avec le module de transfert de phase, le temps de contact sera réduit au seul temps de pré-gélification  $t_{prégel} = 30s$ , puisque l'huile contenant les cristaux d'acétate de calcium sera entièrement évacuée. L'influence de la concentration sur la viabilité cellulaire doit donc être reconduite avec le module de transfert de phase. Les résultats seront présentés au chapitre VI. A ce stade, le procédé 2 donne des capsules plus sphériques mais le procédé 1 semble plus adapté car moins toxique.

## Chapitre III – Optimisation de la pré-gélification

### III.3.2 Caractérisation mécanique des capsules

La résistance mécanique des capsules est évaluée en fonction de deux tests, la résistance au gonflement osmotique et la résistance en compression. Les capsules étudiées sont conservées dans différents milieux dont les compositions sont indiquées dans le tableau Figure 98. Le milieu RPMI est le milieu de culture des Jurkat et des Pseudo-îlots. Les îlots de Langerhans sont conservés dans un autre milieu le CMRL dont la composition se rapproche du sérum physiologique, avec une concentration de calcium prise à 2mM. Cette concentration est à peu près celle à laquelle seront exposées les cellules après implantation<sup>15</sup>.

	Bain gélifiant	Sérum physiologique	Milieu de culture RPMI	Milieu de culture CMRL
[CaCl <sub>2</sub> ] mM	100	2	0	1.8
[NaCl] mM	80	150	103	117
[Hepes] mM	10	10	0	0

Figure 98 – Concentrations ioniques des différentes solutions de stockage des capsules.

#### III.3.2.1. METHODES D'ANALYSE

##### III.3.2.1.1. Gonflement osmotique

Le gonflement osmotique a été expliqué dans le chapitre I.2.1.3.1. Il se produit lorsque la capsule est conservée dans un milieu de concentration en calcium faible voire nulle [285][56]. Les ions sodium et calcium ont tendance à s'équilibrer au travers de la capsule poreuse. Si le milieu final est dépourvu de calcium, la pression osmotique est tellement importante qu'elle peut aller jusqu'à rompre la structure. Cette pression osmotique doit être compensée avec une structure solide du gel.

Le gonflement osmotique dans les milieux est exprimé en pourcentage par rapport à la taille du même lot de capsules conservé en bain gélifiant pendant plus de deux jours.

##### III.3.2.1.2. Résistance mécanique

Pour les tests en compression, le texturomètre présenté en partie II.4.3.1.1. est utilisé. L'incertitude de mesure de l'appareil sur des billes de 1 mm a été évaluée à 10%. Pour les capsules de 200µm, une seule capsule ne suffit pas à être détectée avec l'appareil. Les mesures sont effectuées sur 5 à 10 capsules et le module mesuré est divisé en conséquence.

Les tests de compression sont réalisés pour les différents procédés de pré-gélification avec une conservation en bain gélifiant, en sérum physiologique ou dans un milieu cellulaire RPMI dépourvu de calcium. Les temps de gélification testés sont de 1min, 10min et 20min.

#### III.3.2.2. GONFLEMENT OSMOTIQUE

##### III.3.2.2.1. Procédé 1

L'influence du tampon de conservation est illustrée pour la condition  $t_{\text{prégel}}=30\text{s}$  et  $t_{\text{gel}}=10\text{min}$  pour le procédé 1 avec une concentration de 0,35% (w/w) et pour une gélification externe sans acétate de calcium. Les capsules sont gélifiées dans le bain de calcium à 100 mM, puis après 10 min de gélification sont conservées soit dans du sérum physiologique (2 mM de calcium) soit dans le milieu de culture dépourvu de

<sup>15</sup> Discussion avec Pr. Pierre-Yves Benhamou

## Chapitre III – Optimisation de la pré-gélification

calcium (RPMI, milieu Jurkat). Les capsules sont observées 1 semaine après ce changement de milieu (Figure 99).

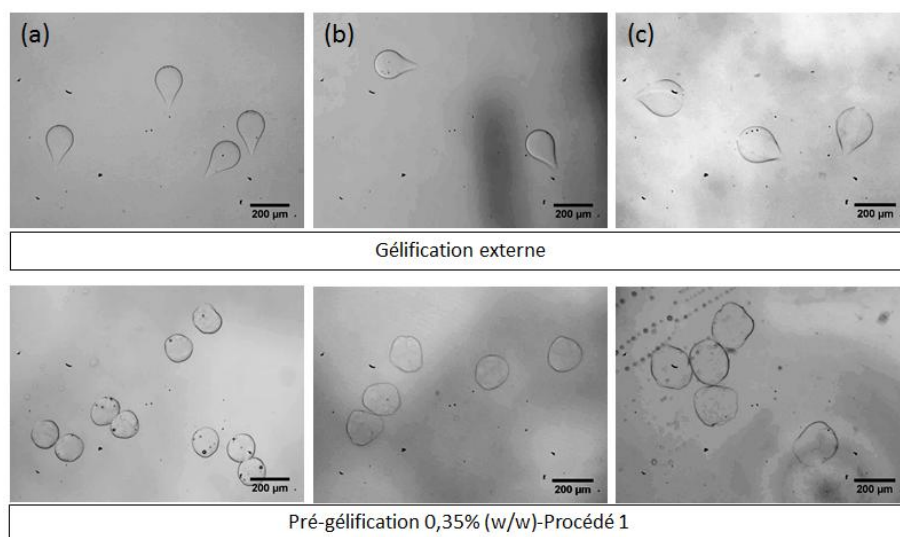


Figure 99 – Capsules obtenues en gélification externe ou avec un procédé 1 de pré-gélification a) Capsules conservées dans le bain gélifiant à 100 mM CaCl<sub>2</sub>, b) Capsules conservées dans du sérum physiologique à 2 mM CaCl<sub>2</sub>, c) Capsules conservées dans du milieu de culture à 0 mM CaCl<sub>2</sub>.

Au bout de 6 jours, les capsules dans le sérum physiologique sont intactes, alors que celles dans le milieu de culture présentent des fissures ou ont éclatées (Figure 99-b). La différence de gonflement osmotique par rapport à une gélification infinie est significative. Pour une conservation en sérum physiologique, le gonflement est de l'ordre de 15 à 20% et pour conservation en milieu de culture type Jurkat, il est doublé et atteint près de 40%.

Le gonflement osmotique déforme également les capsules. Plus les capsules gonflent, plus leurs défauts de pré-gélification sont rendus visibles. La sphéricité trouvée et optimisée en début de chapitre n'est plus la même après gonflement osmotique, phénomène déjà remarqué lors de l'encapsulation de cellules (III-3.1.2). Ce phénomène est plus minime avec une conservation en sérum physiologique, car le gonflement est plus réduit.

### III.3.2.2.2. Procédé 2

Un calcul de sphéricité, avant et après gonflement, est effectué sur des capsules produites avec le procédé 2 de pré-gélification, ayant les meilleurs indices de sphéricité (Figure 99). En gélification infinie, les indices de circularité sont égaux à  $c=0,89 (\pm 1\%)$ ,  $r=1,03 (\pm 1,7\%)$  et après gonflement osmotique en sérum physiologique, les indices sont de  $c=0,87 (\pm 1\%)$ ,  $r=1,07 (\pm 3\%)$ . L'impact du gonflement osmotique sur la sphéricité des capsules confirme que notre méthode de pré-gélification développée n'est pas optimale. La première couche gélifiée d'alginate n'est pas homogène et les défauts sont plus visibles après gonflement. L'optimisation du procédé de pré-gélification est un axe de recherche encore en cours d'investigation.

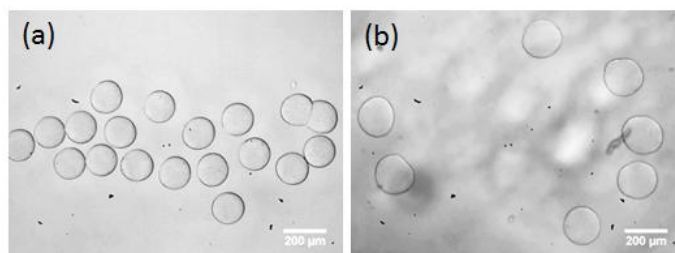


Figure 100 - Déformation due au gonflement osmotique dans le sérum physiologique (procédé 2)  
a) Concentration 100 mM, b) Concentration 2 mM.

### III.3.2.3. RESISTANCE EN COMPRESSION

Le gonflement osmotique a tendance à fragiliser la structure de la capsule [58]. Il en résulte des résistances aux tests de compression significativement différents. Plus la structure est fragilisée, plus le module d'Young est faible. Ces modules sont évalués pour la gélification en bain externe de calcium avec une conservation en bain de calcium 100 mM, en sérum physiologique 2mM et en milieu de culture sans calcium (Figure 101). Les mesures indiquées sont la moyenne de 10 mesures sur 10 capsules provenant d'un même lot.

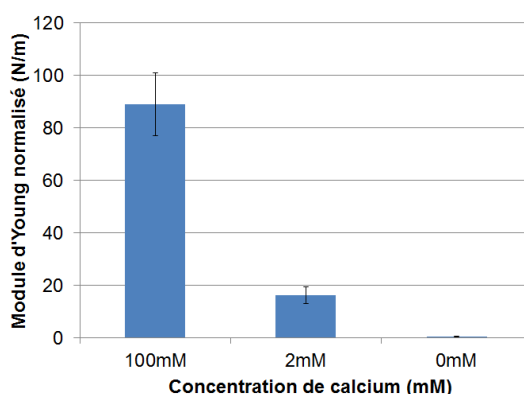


Figure 101 - Résistance mécanique en fonction de la concentration en calcium du milieu de conservation ( $n=1$ ).

Pour la gélification en bain externe de calcium, le module d'Young obtenu en gélification infinie est de l'ordre de 90 N/m. En diminuant la concentration à 2mM, après 10min dans la solution à 100mM, le module d'Young est divisé par 6, la valeur obtenue est plutôt de l'ordre de 15 N/m. Pour une concentration à 0mM, les capsules sont difficilement détectables par l'appareil et le module évalué est inférieur à 5 N/m.

**La condition de concentration à 2mM est retenue pour tester le module d'Young des différentes conditions de pré-gélification et gélification. Cette concentration est proche d'une part de la concentration de calcium dans le milieu de conservation des îlots et d'autre part de la concentration à laquelle seront exposées les capsules après implantation. De plus, c'est une concentration détectable par le texturomètre.**

### III.3.2.4. INFLUENCE DU PROTOCOLE DE PRE-GELIFICATION SUR LA RESISTANCE MECANIQUE DES CAPSULES

#### III.3.2.4.1. Influence de la pré-gélification

La résistance mécanique des différents procédés de pré-gélification a été testée dans le but d'évaluer tout d'abord, si la couche de pré-gélification confère aux capsules des propriétés intéressantes, puis d'observer s'il y a une différence entre les procédés de préparation de l'acétate de calcium (procédé 1 et 2).

## Chapitre III – Optimisation de la pré-gélification

Pour commencer, des tests sont réalisés après 2 jours de conservation à 100 mM  $\text{CaCl}_2$ . Les résultats sont présentés sur le graphique Figure 102 en fonction des différents procédés de pré-gélification. Les tests ont été exécutés sur 5 capsules par test de compression et les résultats exposés sont la moyenne sur 10 tests. Les barres d'erreur présentent les écarts-type inter-expériences ( $n=2$ ). Les écarts-type intra-expérience (au sein d'un même lot de capsule) sont de l'ordre de 10 à 15% pour tous les lots, ce qui est légèrement plus élevé que les écarts-type trouvés pour des billes de 1mm (à 10%) (cf.II.4.3.2).

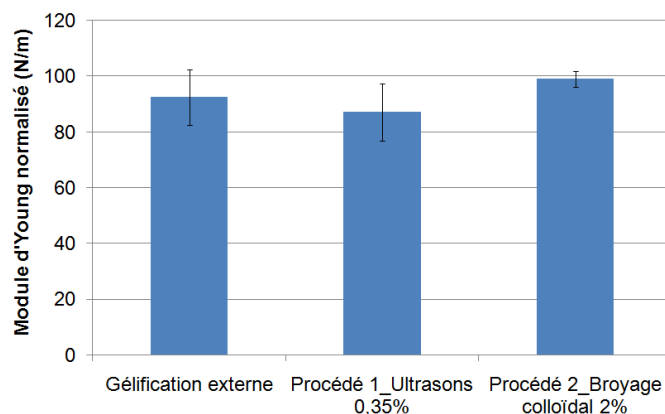


Figure 102 - Résistance mécanique des capsules conservées à 100 mM de  $\text{CaCl}_2$  pour différents protocoles de pré-gélification.

Les modules obtenus pour les procédés de gélification externe et avec le procédé 1 sont équivalents. En revanche, le procédé 2 semble conférer aux capsules une meilleure résistance mécanique.

**Entre les deux procédés, le module d'Young est légèrement plus important pour les capsules faites par la pré-gélification avec le procédé de broyage colloïdal qu'avec les ultrasons. Il reste à confirmer cette tendance observée dans le sérum physiologique.**

### III.3.2.4.2. Influence du temps de gélification $t_{gel}$

Dans l'état de l'art, le temps de gélification des capsules n'est pas bien défini. L'équipe de Thu [65] observe le front de gélification par microscopie confocale et définit le temps de gélification comme le moment où le front atteint le centre de la capsule (vitesse de l'ordre de  $0,1 \text{ mm/min}^{-1}$ ). D'autres équipes prétendent que ce temps n'est pas suffisant et que le temps de consolidation de la structure est beaucoup plus long [58] ( $\geq 1 \text{ h}$ ). Les mesures sont effectuées ici pour une pré-gélification commune de 30s avec des temps de gélification de 1 min, 10 min et 20 min. La gélification externe, la pré-gélification par le procédé 1 et par le procédé 2 sont évaluées. Avec un protocole de lavage manuel, il n'est pas pertinent de considérer des temps de gélification inférieurs à 1 min.

Les résultats sont reportés sur le graphique Figure 103. Les essais ont été réalisés sur un minimum de 2 lots différents de capsules, avec pour chaque fois une statistique sur 10 essais sur 10 capsules d'un même lot. Les résultats présentés ont été normalisés par le diamètre des capsules détectées. Les écarts-type indiqués sont ceux entre les différents lots testés.

Quel que soit le procédé de pré-gélification, les barres d'erreur entre capsules d'un même lot (écarts-type dit intra-expériences) obtenues sont de 25% à 30%, ce qui est considérable. Il est donc difficile d'en tirer des conclusions. Pour la gélification externe, les écarts-type intra-expériences sont un peu meilleurs à 17%. En revanche, les écarts-type inter-expériences sont plus faibles pour la gélification externe que pour les procédés avec une étape de pré-gélification.

## Chapitre III – Optimisation de la pré-gélification

Pour la gélification externe, il semble y avoir une tendance à ce que les modules soient plus faibles pour un temps de gélification de 1 min que pour les deux autres temps de gélification. La différence est notamment marquée entre un temps de gélification de 10 min et de 1 min.

Malgré les barres d'erreurs importantes, il peut néanmoins être noté que pour des temps de gélification faibles (~1min), la résistance des capsules semble plus faible pour la gélification externe que pour les procédés avec une étape de pré-gélification. Par contre, au vue des barres d'erreur, il est difficile de conclure d'une différence entre les deux procédés de pré-gélification.

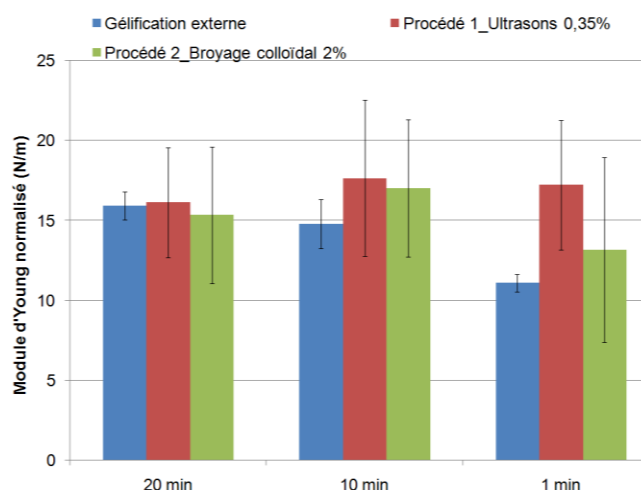


Figure 103 - Résistance mécanique des procédés en fonction du temps de gélification

Il semble y avoir un apport de la pré-gélification par rapport à la gélification externe pour des temps de gélification court (~1min). En revanche, aucune conclusion ne peut être faite concernant les deux procédés de pré-gélification. En effet, les barres d'erreur obtenues sont trop importantes. Ces écarts-type traduisent un manque de reproductibilité entre capsules et entre expériences. Comme nous l'avons mentionné, ce protocole manuel inclut des différences de temps de gélification dans un même lot de capsules ainsi qu'un protocole de lavage difficilement reproductible. L'étude mécanique en fonction du temps de gélification doit être menée sur le prototype final automatisé, où les capsules seront produites suivant un procédé similaire.

### III.4 CONCLUSION

Au cours de ce chapitre, nous avons adapté la gélification proposée par l'équipe de Zhang [223]. Cette méthode de gélification est utilisée pour commencer à gélifier les gouttes dans le flux d'huile avant qu'elles ne soient transférées en bain externe de calcium et évite ainsi la déformation en larme obtenue en simple gélification externe. Cette méthode de pré-gélification a été évaluée en fonction des deux critères primordiaux pour l'encapsulation et l'implantation de cellules que sont la circularité des capsules et la non toxicité pour les cellules encapsulées.

Le procédé de pré-gélification a été optimisé en fonction de différents paramètres : la taille des cristaux présents en suspension, la concentration d'acétate de calcium présente dans l'huile ainsi que le temps de contact  $t_{\text{prégel}}$  entre la goutte et les cristaux d'acétate de calcium.

Tout d'abord, nous avons montré une influence importante de la taille des cristaux sur la sphéricité des capsules. Plus les cristaux sont fins, plus les capsules obtenues sont sphériques. Le protocole de préparation de la suspension d'acétate de calcium a donc été optimisé afin d'avoir des cristaux les plus fins possibles en suspension. Deux procédés de préparation ont été sélectionnés : le broyage par ultrasons à

## Chapitre III – Optimisation de la pré-gélification

---

0,35% (w/w) et le broyage colloïdal à 2% (w/w). Pour ces deux procédés, le temps  $t_{\text{prégel}}$  optimisé est de 30 s, ce qui est raisonnable pour une intégration système. Par contre, ces deux procédés de pré-gélification optimisés présentent un défaut majeur, puisque les surfaces des capsules sont visiblement rugueuses et inhomogènes.

Nous sommes donc conscients que cette méthode de pré-gélification n'est pas la méthode idéale et devra encore faire l'objet de multiples investigations. Cependant, dans le cadre de ce projet, ce point de fonctionnement permet de faire une preuve de principe du module de transfert de phase, puis du système global automatisé en produisant des capsules sphériques et monodisperses.

Les études de viabilité mènent à la conclusion suivante : la concentration de l'agent pré-gélifiant et le temps de contact avec l'acétate de calcium sont cruciaux pour la viabilité des cellules. Cependant cette influence a été évaluée en prenant en compte une exposition à l'acétate de calcium de 1 min, 10 min ou 20min. Pour les temps de gélification de 10 min et 20 min, ce temps d'exposition est respectivement 10 et 20 fois supérieur au temps auquel seront exposées les cellules avec le module automatisé. Le temps de 1 min, qui est le temps pour lequel la toxicité est la plus faible, se rapproche le plus du système intégré, où le temps de contact sera limité à la pré-gélification de 30s. Ce chapitre met donc en évidence l'utilité du module de transfert de phase.

Les tests mécaniques ont permis de percevoir un potentiel apport de la pré-gélification, puisque pour un temps de gélification court ( $\leq 1\text{min}$ ), il permet d'atteindre des modules d'Young plus élevés qu'avec une simple gélification externe.

Par contre, ces tests de résistance mécanique sur des capsules fabriquées manuellement et avec un procédé non automatisé se sont révélés non reproductibles, surtout avec une étape de pré-gélification avec les cristaux d'acétate de calcium. La volonté d'automatiser ce procédé de pré-gélification prend alors tout son sens.

---

## IV - FONCTIONNEMENT ET OPTIMISATION DU TRANSFERT DE PHASE

---





## Chapitre IV – Fonctionnement et optimisation du transfert de phase

---

Le transfert de phase est le cœur de ce système d'encapsulation et le centre de ce projet de thèse. C'est ce module qui permet d'automatiser l'étape de gélification des gouttes d'alginate en les transférant du flux d'huile vers le flux gélifiant. Le procédé se déroule à pH physiologique et ne nécessite ensuite aucun lavage puisque les capsules sont récupérées directement en phase aqueuse. Très peu de systèmes existent actuellement. Nous citerons les travaux de Wong et al. [232] et de Deng et al [233] qui se rapprochent le plus de notre système.

Dans ce chapitre, nous étudions l'enchaînement des trois premières étapes du procédé d'encapsulation de cellules : la formation de gouttes d'alginate monodisperses avec le module MFFD, leur pré-gélification par l'acétate de calcium et leur transfert en phase gélifiante. L'idée du transfert de phase a été brevetée lors de la thèse de S. Le Vot [79]. Malgré une première preuve de concept, plusieurs géométries de transfert ont été imaginées et fabriquées mais n'ont pas été testées. Cette partie vise à décrire le fonctionnement du module de transfert et à tester les différentes géométries pour en déduire les paramètres (pressions d'entrée et dimensions géométriques de la chambre) qui garantissent un fonctionnement optimum de ce module pour l'encapsulation de cellules. Le cahier des charges pour ce système diphasique est divisé en deux points :

- Le critère de fonctionnement implique deux conditions: le passage des gouttes d'alginate doit se faire de façon systématique (le rendement de transfert attendu est de 100%) et la position et la stabilisation de l'interface huile/calcium doivent permettre d'éviter toute pollution en huile du lot final de capsules.
- Les critères de performance spécialement imposés par l'application : les capsules doivent être sphériques. La fréquence et le temps de fonctionnement doivent être les plus élevés possibles afin de produire suffisamment de capsules en un minimum de temps dans la perspective d'une implantation. Les tests *in vivo* requièrent l'implantation de 11 000 IEQ/kg [286] et donc d'autant de capsules.

Le chapitre s'articule de la façon suivante ; après une brève présentation du fonctionnement global du module de transfert et des géométries testées, les différentes géométries seront d'abord évaluées en fonction du critère de fonctionnement. Ce critère permettra de sélectionner les géométries optimales, qui seront alors évaluées suivant le critère de performance. Enfin, des changements géométriques seront proposés pour perfectionner le système.

### IV.1 PRESENTATION DE LA PROBLEMATIQUE

#### IV.1.1 Etat de l'art : les systèmes existants

---

Les microsystèmes actuels, qui permettent la production de capsules sphériques, travaillent majoritairement sur la base d'une gélification en flux d'huile (cf. chapitre I.3.2.3). Les capsules sont donc récupérées en bain d'huile. Après le passage en microsystème, de nombreux lavages sont nécessaires pour éliminer cette huile. De plus, une présence trop longue dans l'huile maintient les cellules en anoxie ce qui peut rendre le procédé toxique.

Le transfert de particules d'une phase huileuse à une phase aqueuse est donc une brique technologique intéressante pour l'encapsulation de cellules. Les capsules récupérées en bain aqueux n'ont plus besoin de lavages et le temps de contact des cellules avec l'huile peut être limité au procédé de gélification seul.

##### IV.1.1.1. GUIDE DE GOUTTES AU TRAVERS D'UNE INTERFACE

Il existe différentes stratégies pour transférer des gouttes d'un flux vers un autre flux. Le principe est d'ajouter un élément de guidage pour forcer les particules à être déviées. Les articles de Kantak [287] puis

## Chapitre IV – Fonctionnement et optimisation du transfert de phase

de Sochol [288] utilisent des piliers de déviation. Respectivement des gouttes d'eau et des billes solides sont guidées au travers de différentes solutions de polyélectrolytes (Figure 104). Au fur et à mesure de leur évolution sur le rail de piliers, les particules sont fonctionnalisées par différentes couches de polyélectrolytes. Ces systèmes démontrent qu'il est possible de dévier efficacement des gouttes ou des particules par un rail de micropiliers. Cependant, les différents fluides à traverser sont ici aqueux.

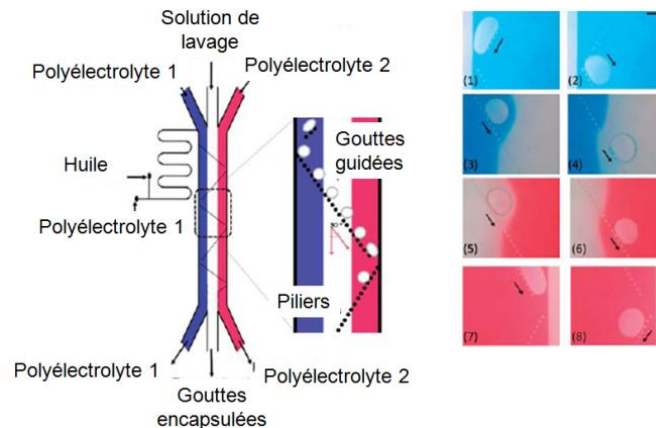


Figure 104 – Guide de gouttes au travers de solutions de polyélectrolytes [287].

### IV.1.1.2. TRANSFERT DE PARTICULES D'UNE PHASE HUILEUSE VERS UNE PHASE CALCIUM

Très peu de systèmes traitent du problème de transfert de particules d'une phase organique vers une phase aqueuse. En effet, le problème est plus délicat car l'interface formée entre deux fluides non miscibles est plus difficile à traverser qu'une séparation entre deux fluides miscibles.

Au travers de nos recherches bibliographiques, nous avons répertorié trois systèmes proposant un tel transfert.

Le système présenté par Matosevic [234] consiste en la production de vésicules de phospholipides. Des gouttes de composition cytoplasmique produites dans l'huile sont déviées à l'aide d'une forme triangulaire vers une phase aqueuse (Figure 105). Le flux d'huile est évacué par un canal perpendiculaire au flux principal.

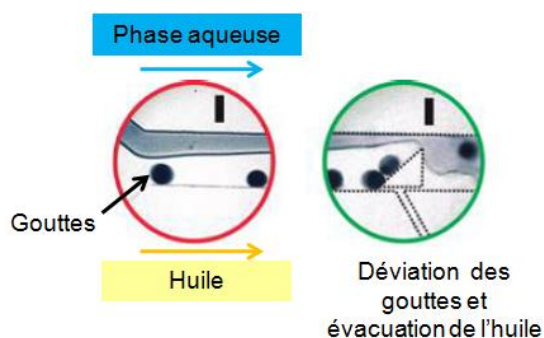


Figure 105 – Déviation de gouttes aqueuses par un élément triangulaire [234].

Les systèmes de Wong [232] et de Deng [233] (Figure 106) ajoutent une contrainte supplémentaire en manipulant de l'alginate. Pour ces deux systèmes, les gouttes d'alginate arrivent déjà gélifiées au niveau du transfert. Wong *et al.* utilisent la gélification interne et Deng *et al.* utilisent la méthode de gélification par coalescence [289] qui se fait en amont du transfert. Les deux systèmes sont régulés en débit.

## Chapitre IV – Fonctionnement et optimisation du transfert de phase

Dans ces articles, les auteurs s'intéressent à la stabilisation de l'interface pour éviter la pollution d'huile et au rendement de passage des capsules qui doit être de 100%. Nous retrouvons les contraintes que nous avons répertoriées sous le terme de fonctionnement système.

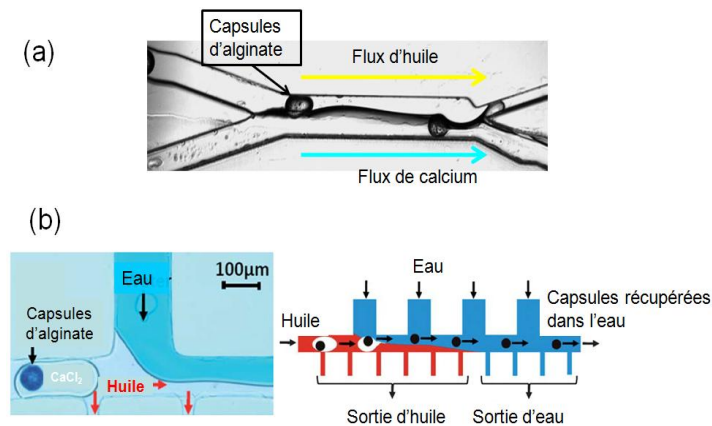


Figure 106 – Systèmes de transfert de phase, a) Dispositif de Wong et al., b) Dispositif de Deng et al.

Le système de Wong (Figure 106-a) transfère les capsules par des considérations hydrodynamiques dépendant de la vitesse des flux et de leur viscosité. Aucun élément de déviation n'est utilisé pour dévier les capsules. La stabilisation de l'interface est favorisée par une fonctionnalisation localisée. Seul le canal d'huile est hydrophobe, le canal de calcium est laissé hydrophile. Pour des débits bien choisis, le rendement trouvé est proche de 100%. Les conditions de stabilité seront expliquées en détails dans la partie **Error! Reference source not found.**

Le dispositif de Deng et al. [233] fonctionne sur la base d'un drainage progressif de l'huile au travers de canaux plus petits perpendiculaires au flux principal (Figure 106-b). C'est donc le flux d'huile qui est dévié et non la capsule. Cette dernière, contenue dans une goutte de calcium, est transférée une fois que la goutte a coalescée avec la phase aqueuse. L'article décrit l'optimisation des débits pour éviter la pollution d'huile dans le canal d'eau et démontre les améliorations obtenues sur la viabilité cellulaire. Le rendement de passage est de 100%.

Ces systèmes et notamment ceux de Wong et de Deng seront une source de comparaison pour notre microsystème, qui a la même fonction, transférer des gouttes d'alginate d'une phase huileuse vers une phase aqueuse.

### IV.1.2 Système proposé et fonctionnement global

Dans ce chapitre, nous associons les trois premières étapes de notre procédé d'encapsulation : la formation de gouttes, l'étape de pré-gélification et l'étape de transfert. Le schéma Figure 107 représente les différents modules utilisés et leur enchainement. Nous nous attachons à décrire le fonctionnement global du transfert de phase et à expliquer les éléments mis en place pour qu'il réponde aux critères cités précédemment. Dans tout ce chapitre, sauf lorsque cela est précisé, la pression d'huile avec la suspension d'acétate de calcium est égale à la pression d'huile.

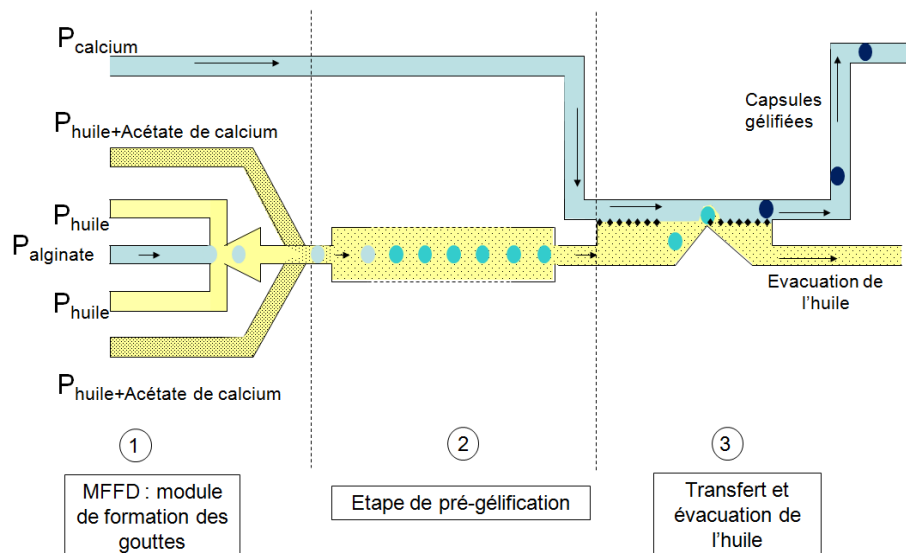


Figure 107 – Représentation schématique du système étudié.

### IV.1.2.1. LE MONTAGE UTILISE

Les puces réalisées lors de la thèse précédente sont composées d'un module de formation de gouttes et d'un module de transfert de phase en série et espacés seulement par un canal de 3 mm de longueur par 200  $\mu\text{m}$  de largeur. Le temps laissé pour la pré-gélification est donc trop court. Pour réaliser nos expériences, nous avons mis en série deux puces de ce type, une pour chaque module (Figure 108). Ces puces sont reliées par une connectique capillaire/tygon d'une longueur de 10 cm permettant d'avoir un temps de pré-gélification de 30s pour une pression d'huile de 350 mbar. Les entrées et sorties non utilisées sont bouchées avec de la colle (indiquées par une croix rouge sur la Figure 108). Pour plus de précision sur le montage, le lecteur peut se reporter à la partie II.1.2.3.

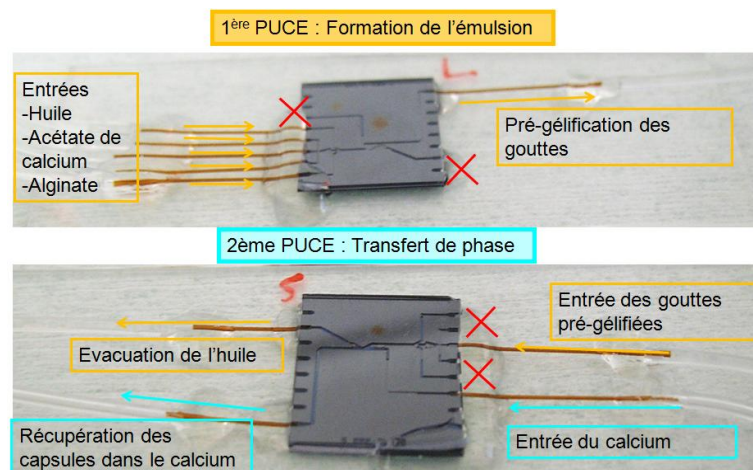


Figure 108 - Schéma du dispositif : deux puces avec la même géométrie pour réaliser les deux fonctions : production de l'émulsion monodisperse et transfère des gouttes vers une phase aqueuse gélifiante.

### IV.1.2.2. STABILISATION DE L'INTERFACE

Le dispositif présente deux principaux circuits fluidiques : le circuit d'huile et le circuit de calcium qui se rejoignent dans la chambre de transfert puis se séparent à sa sortie. Ces deux flux forment une interface visible qu'il faut positionner et stabiliser pendant toute la durée du transfert afin d'éviter que l'huile ne passe dans le canal de calcium.

## Chapitre IV – Fonctionnement et optimisation du transfert de phase

Le positionnement et la stabilisation sont fonction des pressions d'huile  $P_{\text{huile}}$  et de calcium  $P_{\text{calcium}}$  imposées en entrée du système. Pour la majorité des puces, leur contrôle est facilité par la présence d'un rail de micropiliers horizontaux dits de stabilisation en bout de chambre. Pour une pression en entrée de  $P_{\text{huile}}=500$  mbar, le positionnement de l'interface en fonction de  $P_{\text{calcium}}$  est décrit sur la Figure 109.

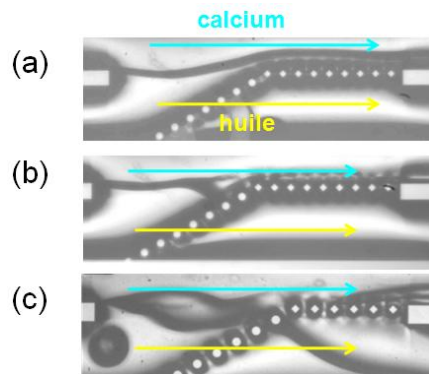
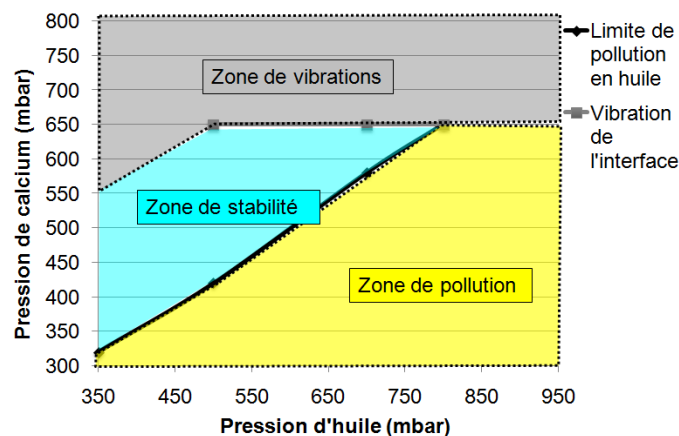


Figure 109 - Positionnement de l'interface dans la chambre microfluidique pour différents couples de pressions ( $P_{\text{huile}}$  ;  $P_{\text{calcium}}$ ), a)  $P_{\text{calcium}}=350$  mbar, b)  $P_{\text{calcium}}=450$  mbar, c)  $P_{\text{calcium}}=900$  mbar

Pour une pression d'huile fixée, en augmentant la pression de calcium, nous distinguons trois zones :

- Lorsque la pression de calcium n'est pas assez importante, un film d'huile s'écoule dans le canal de calcium. Cette condition est à proscrire car la contamination en huile est considérable (Figure 109-a).
- A partir d'une certaine pression de calcium, l'interface s'accroche sur les piliers de stabilisation (Figure 109-b). Le canal de calcium devient alors étanche à l'huile qui est contraint de s'écouler au travers du réseau de micropiliers dans son canal d'évacuation (en bas à droite). C'est la zone de stabilité.
- A partir, d'une certaine pression de calcium, des vibrations importantes apparaissent au niveau de l'interface empêchant le bon fonctionnement du transfert (Figure 109-c). C'est la zone de vibrations.

Ce fonctionnement est représenté schématiquement en fonction des pressions sur la Figure 110 et sera confirmé par une étude détaillée (**Error! Reference source not found.**). La zone d'intérêt est bien sur la zone de stabilisation en bleu, la zone de vibrations à trop fortes pressions de calcium est représentée en gris et la zone de pollution par l'huile en jaune. Ces trois zones existent pour toutes les géométries testées, mais nous verrons que la limite de la zone de vibrations peut être retardée pour certaines géométries **Error! Reference source not found.**



## Chapitre IV – Fonctionnement et optimisation du transfert de phase

Figure 110 – Schéma des différentes zones de fonctionnement du module de transfert en fonction du couple de pressions en entrée  $P_{\text{huile}}$  et  $P_{\text{calcium}}$ .

### IV.1.2.3. MECANISME DE PASSAGE DES GOUTTES

Le second critère est le rendement qui doit être de 100%. Sans système de guidage, les gouttes d'alginate ont tendance à vouloir rester dans le flux d'huile [79][224]. Il faut donc forcer les gouttes à passer cette interface.

La façon de guider les gouttes d'alginate diffère suivant les géométries. Néanmoins le principe général reste le même. La séquence Figure 111 illustre le passage d'une goutte d'alginate pré-gélifiée depuis la phase huileuse vers la phase gélifiante aqueuse. Sur cette séquence, l'interface est stabilisée par un couple de pressions  $P_{\text{huile}} = 350$  mbar et  $P_{\text{calcium}} = 320$  mbar. (Figure 111-a). Les gouttes pré-gélifiées arrivent de façon successive et passent l'interface selon le processus décrit ci-dessous :

- Guidage de la goutte d'alginate pré-gélifiée par un élément géométrique (ici en forme triangulaire) vers la phase de calcium (Figure 111, b-c).
- Drainage du film d'huile séparant la goutte de la phase de calcium au travers du réseau de micropiliers (Figure 111, d-e).
- Coalescence et évacuation de la capsule dans la phase de calcium (Figure 111, f). L'interface revient à sa position initiale.

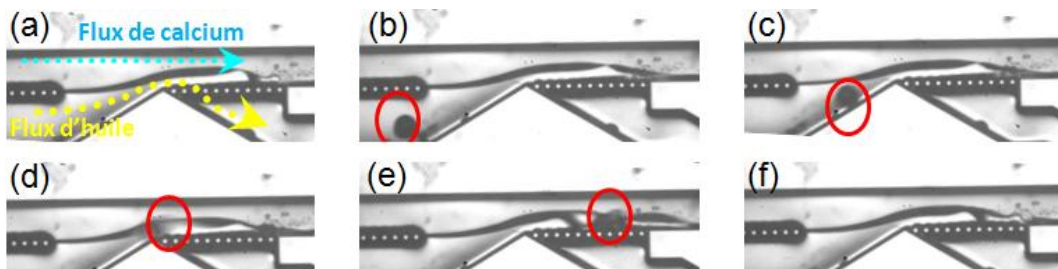


Figure 111 - Fonctionnement du transfert de phase et importance du guidage des gouttes d'alginate.

**Pendant le transfert de la goutte, le réseau de micropiliers de stabilisation restreint l'interface à osciller d'un pilier à un autre de façon contrôlée. Ce réseau a donc deux rôles : un rôle de stabilisation d'interface et un rôle de guidage des gouttes jusqu'à leur coalescence avec la phase aqueuse de calcium.**

### IV.1.2.4. PREREQUIS AU FONCTIONNEMENT : CONDITION DE PRE-GELIFICATION

Les conditions de pré-gélification optimisées au chapitre III étaient une concentration d'acétate de calcium de 2% (w/w) pour un temps de pré-gélification de 30s (cf. chapitre III). Cependant, avec le module de transfert de phase, des conditions fluidiques supplémentaires entrent en jeu. Pour le montage considéré, soit avec une connectique inter-puce de 10 cm, un temps de 30s de pré-gélification correspond à une pression  $P_{\text{huile}} = P_{\text{acétate}} = 350$  mbar. Pour certaines géométries proposées, il sera démontré que la vitesse d'arrivée de la goutte influence le rendement de transfert (cf. **Error! Reference source not found.**). Nous avons donc choisi, pour évaluer le maximum de géométries, de travailler à une pression d'huile de 500 mbar, ce qui réduit le temps de pré-gélification à 15 s.

Le but est de trouver la concentration en acétate de calcium adaptée à ce nouveau temps de pré-gélification pour réaliser l'étude comparative sur les systèmes. L'étude a été réalisée sur deux puces, les plus opposées parmi les géométries à tester, avec deux modes de guidage différents : le guidage par pilier (Figure 112-a) et



## Chapitre IV – Fonctionnement et optimisation du transfert de phase

le guidage par déflecteur (Figure 112-b). Plusieurs concentrations en acétate de calcium ont été testées ; 1% (w/w), 2% (w/w) et 3% (w/w). Pour une concentration plus importante, les canaux d'entrée de la suspension huileuse d'acétate de calcium peuvent se boucher. Le critère évalué est la sphéricité (paramètres circularité et ratio). Les résultats sont reportés dans le graphique Figure 112.

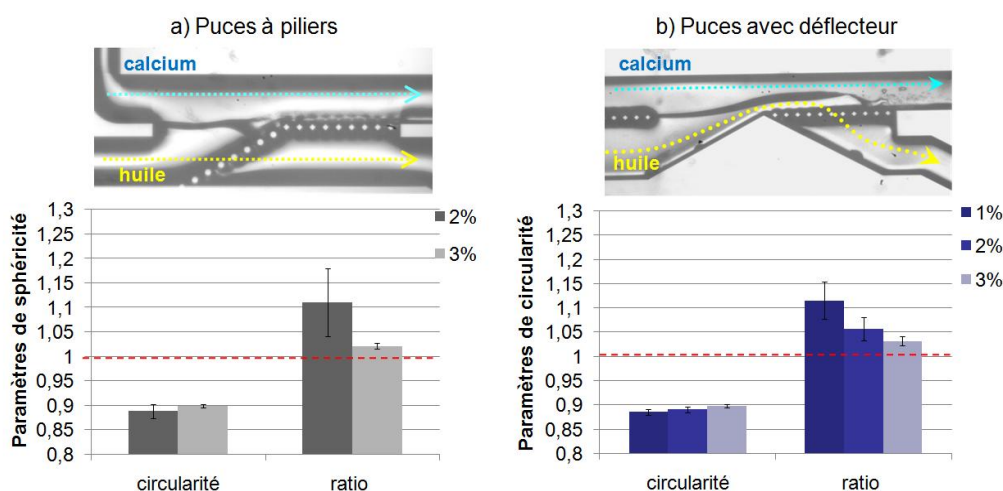


Figure 112 - Déformations des capsules pour différentes concentrations de pré-gélifiant et un temps de pré-gélification de 15s a) Puce à piliers, b) Puce avec déflecteur.

Les puces à piliers ne permettent pas l'obtention de capsules pour une concentration de 1% (w/w) en acétate de calcium. La goutte peu pré-gélifiée se déforme et passe au travers des piliers au lieu d'être déviée (Figure 113). Le plus souvent, l'alginate finit par accrocher sur les piliers et il se forme un amas d'alginate qui obstrue la puce (Figure 113-g).

En augmentant la concentration à 2% (w/w), les gouttes sont mieux pré-gélifiées et passent plus facilement l'interface. Cependant, les capsules obtenues sont d'une part déformées et peu monodisperses et d'autre part, le fonctionnement du système ne dure pas ( $< 15$  min). De la même façon, les gouttes finissent par former un amas d'alginate sur les piliers de déviation. La meilleure concentration pour ce temps de pré-gélification est de 3% (w/w) (Figure 114). La goutte est assez pré-gélifiée et est guidée efficacement par les éléments géométriques (Figure 114, A-E). Même si le flux d'huile entraine la goutte au travers des piliers, elle ne peut pas se déformer. Elle suit alors le réseau de piliers jusqu'à l'interface.

Pour les deux séquences présentées (Figure 113 et Figure 114), il se forme une émulsion de calcium dans la phase d'huile assurant que le canal de calcium est bien étanche au flux d'huile.

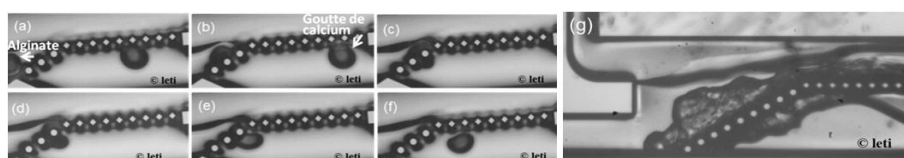
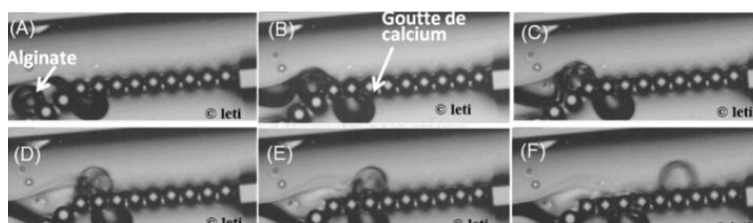


Figure 113 - Effet de la mauvaise pré-gélification en transfert de phase : (a-f) Passage d'une goutte mal pré-gélifiée au travers des piliers ; (g) Bouchage d'une puce suite à la coalescence de plusieurs gouttes.





## Chapitre IV – Fonctionnement et optimisation du transfert de phase

Figure 114 - Passage d'une goutte bien pré-gélifiée : (A-C) Guidage par les piliers, (D-F) Drainage de l'huile et coalescence.

Les puces avec déflecteur permettent la récupération de capsules pour une gamme plus grande de concentration.

Pour une concentration de 1% (w/w), alors que le film d'huile est drainé progressivement au travers des piliers de stabilisation, l'interface presse la goutte contre les piliers et la déforme. Le diamètre de la goutte est réduit de 30% entre la 1<sup>ère</sup> et la dernière image (Figure 115-a). Le taux de pré-gélification de la goutte est suffisant pour qu'elle ne puisse pas passer au travers des piliers de stabilisation mais n'empêche pas la déformation lors du transfert. Les capsules obtenues sont très elliptiques.

En revanche, pour une concentration de 2% (w/w), le phénomène est réduit et pour 3% (w/w), il n'y a pas de réduction visible du diamètre des gouttes au cours du transfert (Figure 115-b). L'impact sur la forme est alors limité et les capsules obtenues sont sphériques. Pour plus d'information sur le fonctionnement de cette géométrie, le lecteur peut se reporter à l'annexe 4.

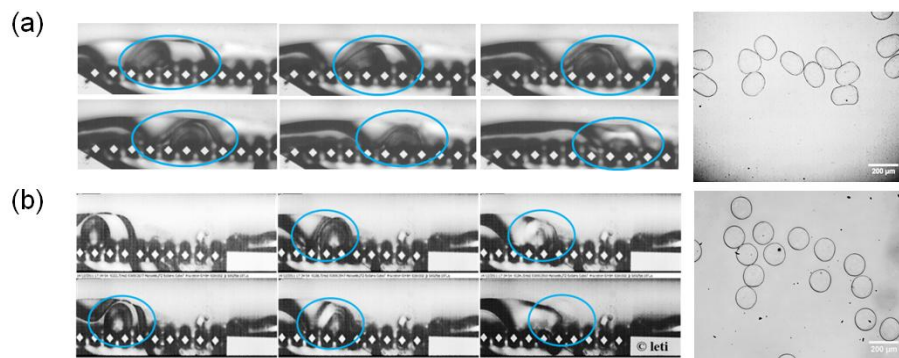


Figure 115 – Optimisation de la pré-gélification pour les puces avec déflecteur, a) 1% (w/w) en acétate de calcium b) 3% (w/w) en acétate de calcium, les pressions sont égales à  $P_{huile} = 500 \text{ mbar}$  et  $P_{calcium} = 420 \text{ mbar}$ .

La pré-gélification est nécessaire pour assurer le guidage des gouttes et donc leur transfert. Avec une pré-gélification insuffisante, soit aucune capsule n'est pas récupérée dans la phase aqueuse et le rendement est nul, soit les capsules récupérées sont totalement déformées. La condition de pré-gélification utilisée tout au long de ce chapitre est donc un temps de pré-gélification de 15 s avec une concentration d'acétate de calcium de 3% (w/w). De cette façon, toutes les géométries sont évaluées dans les mêmes conditions de pré-gélification.

Confidentiel



---

## V - INTEGRATION EN CARTE FLUIDIQUE

---



Confidentiel



---

VI – VERS L'IMPLANTATION :  
CARACTERISATION DES CAPSULES ET  
BIOCOMPATIBILITE DES PROCEDES  
D'ENCAPSULATION

---





## Chapitre VI : Vers l'implantation: caractérisation des capsules et biocompatibilité des procédés d'encapsulation

Dans le chapitre I.2.4, nous avons présenté une liste non exhaustive des méthodes utilisées actuellement pour caractériser les capsules dédiées à l'implantation. Ces méthodes concernent la caractérisation de la biocompatibilité, de la surface, de la porosité et de la résistance mécanique des capsules. Cependant, la variabilité des méthodes de caractérisation ajoutée aux multiples compositions et procédés de fabrication de capsules font qu'il est difficile de trouver des points de comparaison dans l'état de l'art [47].

Ce chapitre présente les premières études de caractérisation effectuées sur les capsules issues des montages à deux et à trois étages (connectique par la tranche ou connectique face arrière). Les caractérisations menées concernent des tests physiques (résistance mécanique et observation de la porosité, cf. II.4) et des tests de biocompatibilité des procédés de fabrication des capsules. Des mesures de viabilité des cellules après encapsulation ainsi qu'un premier test d'implantation de capsules vides sur souris ont été effectués.

### VI.1 CARACTERISATION DES PROPRIETES PHYSIQUES DES CAPSULES

#### VI.1.1 Caractérisation mécanique des capsules en sortie de carte fluidique

Des caractérisations mécaniques ont pu être réalisées en sortie de carte fluidique automatisée à 3 étages. Les conditions du procédé de gélification dans la carte sont : une pré-gélification de 30s avec les deux séries de serpentins, une concentration d'acétate de calcium broyé de 3% (w/w) et un temps de gélification de 30s. Les modules obtenus sont comparés aux modules d'Young de capsules réalisées par gélification externe (temps de gélification de 1 min). La résistance mécanique des capsules fabriquées avec le procédé de pré-gélification non automatisé est également reportée sur ce graphique. Les conditions de gélification sont cependant différentes: temps de pré-gélification de 30s, concentration d'acétate broyé de 2% (w/w) et temps de gélification de 1 min.

Les résultats présentés pour la carte fluidique ont été réalisés sur deux lots de capsules issus de deux cartes différentes. Les essais ont été réalisés 10 fois sur 10 capsules. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-type entre les deux expériences, tandis que la courbe en rouge traduit la variabilité des modules d'Young mesurés au sein d'un même lot de capsules (variabilité dite intra-expérience).

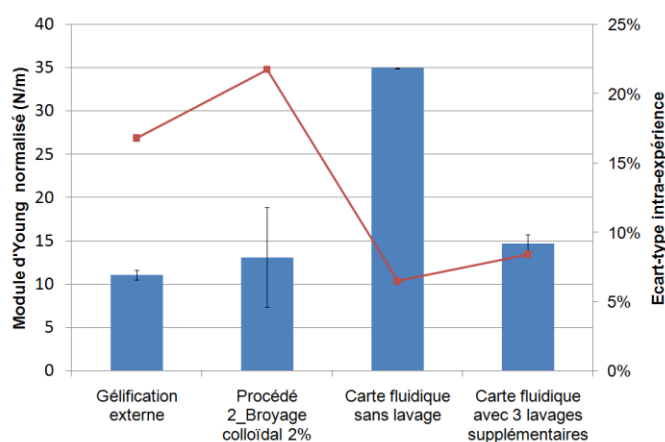


Figure 116 – Comparaison des modules d'Young des capsules avec et sans automatisation.

## Chapitre VI : Vers l'implantation: caractérisation des capsules et biocompatibilité des procédés d'encapsulation

---

Le module d'Young moyen des capsules issues de la carte fluide, analysées sans lavage supplémentaire, est plus élevé que le module d'Young des capsules obtenues avec les procédés de gélification externe ou de pré-gélification sans automatisation. Ce résultat est cohérent car la concentration en calcium de la solution en sortie de carte est plus élevée que 2 mM (cf. **Error! Reference source not found.**), concentration à laquelle sont exposées les capsules des autres procédés. Directement après leur production, une partie des capsules issues de la carte sont lavées manuellement à trois reprises, avec du sérum physiologique à 2 mM. Les modules mesurés redeviennent alors comparables aux modules des procédés non automatisés.

Le module d'Young des capsules est donc très sensible à la concentration en calcium de la solution dans laquelle les capsules sont stockées.

Ce qu'il faut surtout retenir, c'est la différence de reproductibilité entre expériences et au sein d'un même lot de capsules, pour les différents procédés testés. En effet, la différence entre le procédé automatisé et les autres procédés est nette. Les écarts-type inter-expériences (~7% avec lavages supplémentaires et 2% sans) et intra-expérience (~8% avec lavages supplémentaires et 6% sans) sont beaucoup plus faibles pour les capsules issues de la carte fluide, que pour celles fabriquées avec des procédés incluant des étapes manuelles ( $\geq 15\%$ ). L'écart-type inter-expérience trouvé pour la gélification externe est certes faible mais la barre d'erreur intra-expérience reste importante (~17%).

**La carte fluide à trois étages donne des lots de capsules plus reproductibles que ceux issus d'un procédé de gélification manuel. Ceci a été vérifié au travers de tests mécaniques.**

### VI.1.2 Caractérisation de la surface et visualisation de la porosité

---

Dans la partie II.4.2.1, la méthode d'observation de la porosité de l'alginate gélifié a été développée pour des billes de 1 mm. Les billes sont séchées au CO<sub>2</sub> supercritique, puis observées au microscope électronique à balayage. Cette technique de séchage permet théoriquement de conserver la porosité de l'hydrogel en formant des aérogels de même porosité. Ce protocole est appliqué pour la visualisation de capsules d'un diamètre inférieur à 200  $\mu\text{m}$ .

Les conditions d'observation utilisées sont pointues car la matière est très fragile et s'effondre rapidement sous le faisceau d'électron. Les conditions retenues sont rappelées : une énergie de faisceau inférieure à 1kV et une distance de travail inférieure à 3 mm. Le détecteur choisi est le plus fréquemment le SE2, car la matière charge moins qu'en In-Lens.

Deux types de capsules, fabriquées avec un alginate de 3% (w/l) sont observés :

- Des capsules issues de la carte fluide à trois étages. Le procédé de gélification utilisé comprend: un temps de pré-gélification de 30s, une concentration d'acétate de calcium de 3% (w/w) et un temps de gélification d'environ 30s.
- Des capsules issues d'une pré-gélification dans l'acide oléique avec une forme diffuse de calcium, qui semblaient avec une observation au microscope beaucoup plus homogènes (cf. chapitre III.2.4 ).

L'observation après séchage permet de comparer les structures en rugosité de surface, les images à plus ou moins fort grossissement sont représentées sur la Figure 117.

## Chapitre VI : Vers l'implantation: caractérisation des capsules et biocompatibilité des procédés d'encapsulation

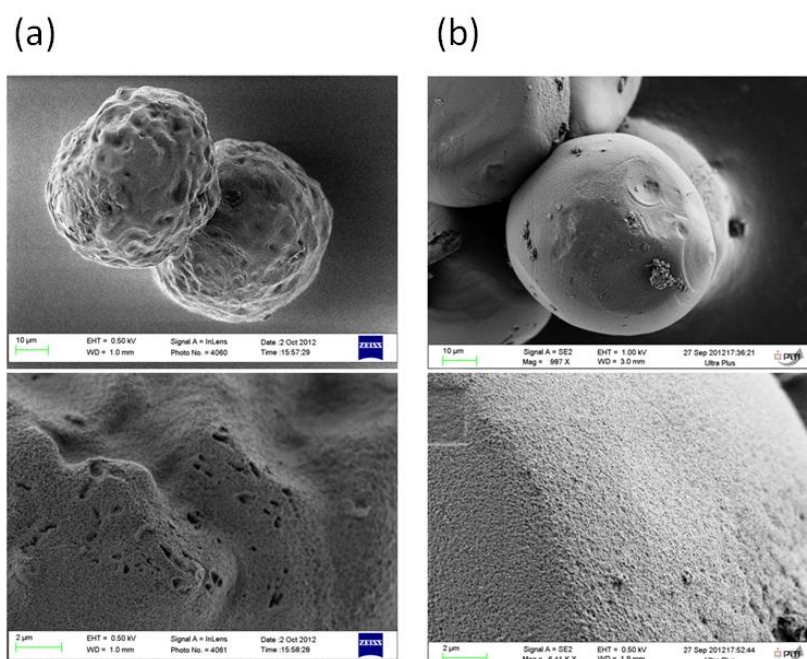


Figure 117 – Aspect des capsules observées au MEB, après séchage au  $\text{CO}_2$  supercritique, a) Capsules issues de la carte fluidique avec une pré-gélification par cristaux d'acétate de calcium. b) Capsules gélifiées par du calcium sous forme diffuse dans l'acide oléique.

Les différences entre les deux procédés de pré-gélification se retrouvent sur ces clichés. Les capsules obtenues par une pré-gélification avec du calcium sous forme diffuse, sont sphériques et présentent une surface bien lisse. Au contraire, les capsules issues du procédé de pré-gélification avec les cristaux d'acétate de calcium apparaissent véritablement « cabossées ». Le protocole de pré-gélification affecte donc bien l'homogénéité de surface des capsules. Ces résultats confirment que la méthode de gélification par acétate de calcium n'est pas une bonne solution dans l'optique d'une implantation et que des alternatives doivent être trouvées.

Cependant, la mesure de la porosité est moins significative. En effet, malgré le séchage au  $\text{CO}_2$  supercritique, une diminution importante de la taille initiale des capsules est visible. Les capsules perdent 50% de leur taille initiale (Figure 118), alors que les billes de 1 mm ne diminuaient que de 9%. La méthode développée est donc moins performante pour des diamètres inférieurs à 200 µm.

En conséquence, la porosité du gel observée n'est pas exactement celle de l'hydrogel car la structure s'est légèrement écrasée après le séchage. Néanmoins, nous évaluons la taille des pores des capsules fabriquées par la carte fluidique à 40 nm (Figure 119).

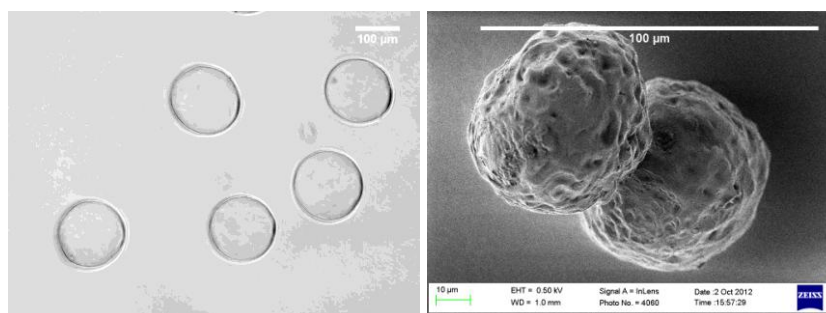


Figure 118 – Diminution de la taille des capsules après séchage au  $\text{CO}_2$  supercritique.

## Chapitre VI : Vers l'implantation: caractérisation des capsules et biocompatibilité des procédés d'encapsulation

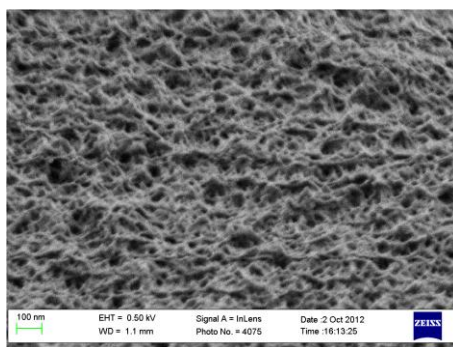


Figure 119 - Porosité observée au MEB, capsule obtenue en sortie de carte fluidique.

La suite des expérimentations a consisté à voir si cette méthode de caractérisation pouvait, même sans donner des valeurs « absolues » de la taille des pores, comparer des capsules issues de protocoles différents de gélification. Le test réalisé compare la porosité de capsules pré-gélifiées par acétate de calcium et conservées en solution à 2 mM de  $\text{CaCl}_2$ , avec la porosité de capsules laissées en bain gélifiant à 100 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Ce second lot de capsules est réalisé par une gélification dans de l'acide oléique (cf. III.2.4). Ce n'est certes pas le même procédé de gélification, mais le but est de retrouver l'effet du gonflement osmotique, qui est théoriquement d'élargir la porosité des capsules.

Sur ce premier essai, la porosité visualisée pour une conservation à 100 mM de  $\text{CaCl}_2$  est significativement plus fine ( $\sim 25$  nm) que pour l'échantillon exposé au gonflement osmotique ( $\sim 40$  nm) (Figure 120). Cette méthode de séchage offre donc bien la possibilité d'observer des différences de porosité. Cette expérience est néanmoins à reconduire avec des capsules réalisées dans les mêmes conditions de pré-gélification/gélification.

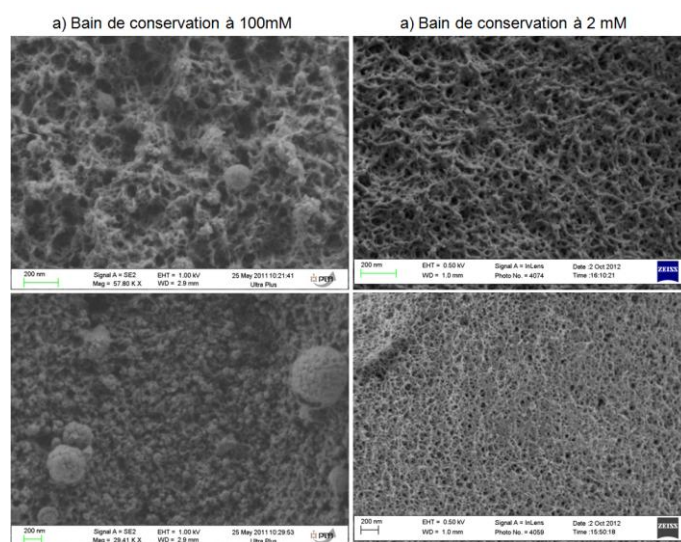


Figure 120 – Comparaison de la porosité pour des capsules conservées à des concentrations de calcium différentes : dans le bain gélifiant à 100 mM et dans le sérum physiologique à 2 mM.

La technique développée pour évaluer la porosité des capsules consiste à sécher les capsules au  $\text{CO}_2$  supercritique pour former des aérogels. Ces aérogels sont ensuite observés au microscope électronique à balayage. Ce procédé semble donner de bonnes indications sur la rugosité de surface des gels obtenus. Cependant, il ne permet pas de conserver exactement la porosité de l'hydrogel, puisque au cours de ce procédé de séchage, le diamètre des capsules a été réduit de 50% par rapport à la taille initiale. La

## Chapitre VI : Vers l'implantation: caractérisation des capsules et biocompatibilité des procédés d'encapsulation

---

porosité observée n'est donc pas la porosité réelle de l'hydrogel. Néanmoins, cette technique devrait permettre de comparer la porosité de capsules réalisées suivant différents procédés de gélification.

### VI.2 BIOCOMPATIBILITE DU PROCEDE D'ENCAPSULATION

#### VI.2.1 Influence du procédé d'encapsulation sur la viabilité des cellules

---

La majeure partie des expériences d'encapsulation ont été réalisées sur les cellules Jurkat. Sur cette lignée, la viabilité est suivie pendant deux jours après encapsulation. Un tout premier test a pu également être effectué avec des îlots pancréatiques humains. Pour les deux lignées, le système utilisé est un montage à 2 étages (jusqu'au transfert en phase de calcium) avec une connectique par la tranche.

La préparation et la stérilisation des microsystèmes ainsi que la préparation de la suspension cellulaire dans l'alginate sont décrites dans le chapitre II.3. Pour toutes ces études, l'alginate ultra-pur est utilisé à une concentration de 3% (w/l) et le temps de gélification dans le calcium est fixé à 10 min.

##### VI.2.1.1. ENCAPSULATION DE JURKAT AVEC LE SYSTEME A DEUX ETAGES

###### VI.2.1.1.1. Les conditions du test d'encapsulation

Dans le chapitre III, il a été démontré qu'une augmentation de la concentration en acétate de calcium dans l'huile, ainsi que du temps de gélification dans le bain externe, avaient un impact négatif sur la viabilité des cellules encapsulées. Ces résultats ont été obtenus avec un système à un étage (cf. III.3), où les cellules étaient exposées aux cristaux d'acétate de calcium pendant le temps de pré-gélification et pendant le temps de gélification.

Dans cette partie, nous présentons les résultats de viabilité après encapsulation avec le module de transfert automatisé en phase calcium. Ce module de transfert permet l'évacuation de l'huile et de l'acétate de calcium toxique en exposition prolongée. Le temps de contact entre les cellules et les cristaux est donc limité au seul temps de pré-gélification. Il s'agit de vérifier si ce temps de contact induit une toxicité.

Les deux procédés de mise en forme de l'acétate de calcium présentés et optimisés au chapitre III sont ici testés. Les cellules sont donc exposées à des concentrations différentes en acétate de calcium suivant le procédé utilisé :

- Le broyage des cristaux par ultrasons puissants (procédé 1), avec une concentration d'acétate de calcium optimisée à 0,35% (w/w) pour un temps de pré-gélification de 30s. Les pressions de fonctionnement en entrée de système sont égales à  $P_{\text{huile}}=P_{\text{acétate}}=350$  mbar,  $P_{\text{calcium}}=320$  mbar et  $P_{\text{alginate}}=325$  mbar.
- Le broyage colloïdal dans l'huile de soja hyper raffinée (procédé 2), avec une concentration d'acétate de calcium de 2% (w/w) et un temps de pré-gélification de 15 s. Les pressions sont égales à  $P_{\text{huile}}=P_{\text{acétate}}=500$  mbar,  $P_{\text{calcium}}=450$  mbar et  $P_{\text{alginate}}=470$  mbar, pour faciliter le fonctionnement du système et éviter le blocage des gouttes dans la connectique (chapitre **Error! Reference source not found.**). Ces conditions ne correspondent pas exactement à celles optimisées dans le chapitre IV, mais elles permettent tout de même de tester l'influence d'une plus grande concentration d'acétate de calcium sur la viabilité cellulaire.



## Chapitre VI : Vers l'implantation: caractérisation des capsules et biocompatibilité des procédés d'encapsulation

### VI.2.1.1.2. L'aspect des capsules obtenues en fonction des différents procédés de gélification étudiés

La Figure 121 récapitule les aspects des cellules encapsulées obtenues avec les différents procédés étudiés tout au long de ce projet : le procédé de gélification simple en bain externe (cf.III.1.1.1), le procédé de pré-gélification suivi d'une gélification en bain externe (cf. III.3.1) et enfin le procédé de pré-gélification avec transfert automatisé en phase de calcium (procédé 1). Les images ont été prises directement après la remise en suspension dans le milieu de culture (RPMI, 0 mM  $\text{CaCl}_2$ ), le gonflement osmotique n'a donc pas encore eu trop d'effet sur l'apparence des capsules.

Les procédés de pré-gélification ont été mis au point pour palier au problème de formation de larve observé pour une gélification simple en bain externe (Figure 121-a), ce qui est vérifié ici en présence de cellules. Les capsules obtenues avec pré-gélification (automatisée ou non) ne présentent en effet aucune forme de larve.

Cependant, pour un même procédé de pré-gélification, les capsules gélifiées en présence de cellules sont nettement moins sphériques et homogènes que les capsules formées en leur absence. Ce phénomène, déjà observé pour les capsules issues de la pré-gélification sans transfert automatisé (chapitre III.3.1-Figure 121-b), se retrouve également pour le montage avec le transfert de phase (Figure 121-c). La présence de cellules modifie le déroulement de la pré-gélification.

Une différence peut tout de même être notée entre les procédés avec et sans transfert automatisé. Avec le transfert de phase, les traces d'huile présentes sur les capsules après le procédé semblent moins importantes. Le lavage est donc plus efficace que 3 lavages réalisés manuellement. Cependant, les capsules en l'absence de cellule ne présentaient aucune trace d'huile visible. En présence de cellules, l'huile adhère plus facilement sur la surface des capsules.

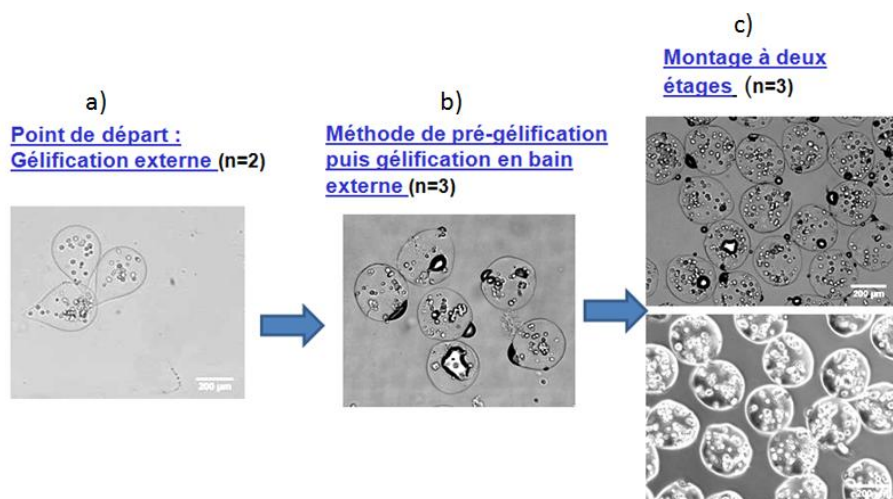


Figure 121 - Aspect des capsules pour les différents procédés d'encapsulation testés au cours de ce projet.

Le second procédé de pré-gélification (procédé 2) mis au point dans le chapitre III, utilise de l'acétate de calcium broyé par broyage colloïdal. L'avantage de cette méthode par rapport à celle utilisant les ultrasons est que les cristaux obtenus sont plus fins. Les capsules réalisées sans cellule, présentaient donc pour ce procédé de meilleurs paramètres de sphéricité et d'homogénéité de surface. Cependant, aucune amélioration entre les deux procédés n'est observée en présence de cellules. La Figure 122 montrent les capsules obtenues sans (Figure 122-a) et avec cellules (Figure 122-b). La différence de sphéricité et de rugosité de surface est flagrante.

## Chapitre VI : Vers l'implantation: caractérisation des capsules et biocompatibilité des procédés d'encapsulation

La présence de cellules dans l'alginate modifie l'aspect des capsules obtenues, elles sont moins sphériques et l'aspect de surface est très rugueux. Les développements menés sur le procédé de pré-gélification par acétate de calcium restent encore à optimiser pour les expériences avec cellules. Des études de viabilité ont tout de même été menées afin de valider l'intérêt du transfert de phase, qui est d'évacuer rapidement et efficacement un agent potentiellement toxique en exposition prolongée.

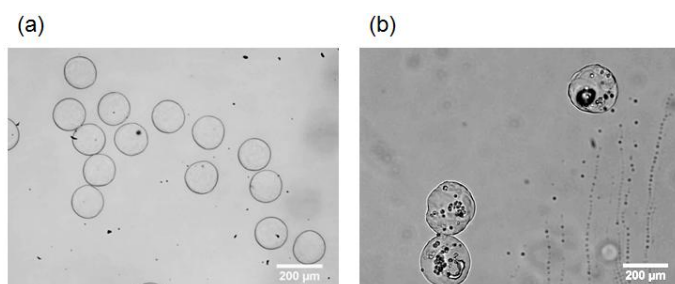


Figure 122 – Capsules issues du procédé 2 de pré-gélification avec transfert automatisé en phase calcium  
a) Sans cellules, b) Avec cellules Jurkat.

### VI.2.1.1.3. Résultats de viabilité après encapsulation et discussion sur les différents protocoles étudiés

Pour les deux conditions de pré-gélification, les expériences d'encapsulation ont été effectuées à trois reprises. Une trentaine de capsules a été analysée par expérience et par jour. La concentration en cellules est de l'ordre de 30 à 60 cellules/capsule. Les écarts-type indiqués représentent l'écart de viabilité entre les trois expériences réalisées.

Ces deux procédés sont comparés sur le graphique Figure 123 avec d'une part les résultats d'encapsulation en bain externe sans pré-gélification et d'autre part les résultats du système non automatisé, pour une pré-gélification de 30 s et une concentration de 0,35% (w/w) en acétate de calcium (conditions du procédé 1).

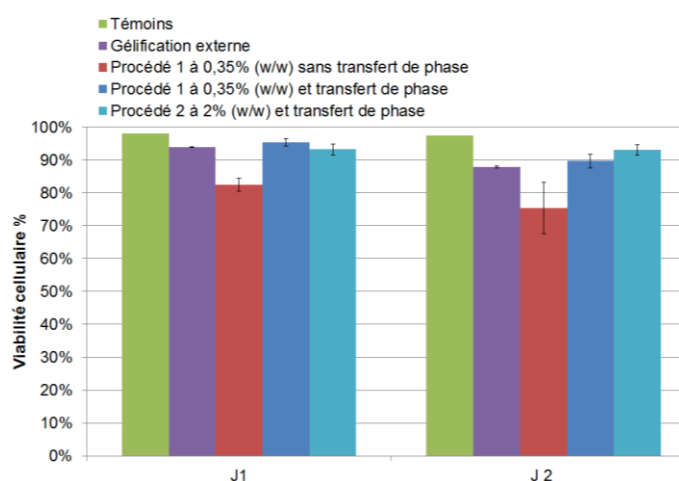


Figure 123 – Evolution de la viabilité des cellules après encapsulation par les différents procédés de gélification.

D'après ces expériences deux principales remarques peuvent être faites :

- Le procédé d'encapsulation avec automatisation du transfert en phase de calcium a un impact positif sur la viabilité cellulaire. La viabilité trouvée est la même que celle obtenue en bain de gélification externe (avec une baisse de viabilité de l'ordre de 5%).



## Chapitre VI : Vers l'implantation: caractérisation des capsules et biocompatibilité des procédés d'encapsulation

- Avec ce transfert automatisé, l'influence de la concentration en acétate de calcium sur la viabilité cellulaire n'est plus observée : la viabilité obtenue pour une concentration de 2% (w/w) est équivalente à celle obtenue pour une concentration de 0,35% (w/w). L'évacuation de l'huile est efficace et permet l'utilisation pour la pré-gélification d'une concentration importante en acétate de calcium.

**Ces résultats démontrent l'intérêt du transfert de phase. Il rend envisageable l'utilisation d'agent gélifiant a priori toxique, dans la mesure où le temps d'exposition des cellules à cet agent est limité et contrôlé. Le transfert de phase pourrait donc être utilisé avec d'autres procédés d'encapsulation comme la gélification interne ou la gélification par acide oléique (chapitre I.3.2.3.2), avec un temps flash de pré-gélification de quelques secondes.**

### VI.2.1.2. PREMIERS TESTS REALISES SUR LES ILOTS DE LANGERHANS AVEC TRANSFERT AUTOMATISE EN PHASE CALCIUM

Ces expériences ont été réalisées une seule fois sur des îlots humains fournis par l'EFS de Grenoble, 30 000 IEQ avec une pureté de 70%.

Les tests d'encapsulation ont été réalisés sur un système avec transfert en phase de calcium et une connectique par la tranche. La géométrie de la puce de transfert utilisée est la géométrie en X. Ces puces ont des canaux de profondeur/largeur égaux à 200  $\mu\text{m}$ . Ainsi, les îlots ont été préalablement triés en taille par sédimentation (~3 min) pour garder seulement les îlots d'une taille inférieure à 200  $\mu\text{m}$ . Les îlots sont centrifugés à 300 g pendant 5 minutes. Trois lavages sont réalisés avec le tampon d'alginate, afin d'enlever le milieu de culture qui a pour effet une diminution de l'angle de mouillage de la suspension sur silicium (cf. **Error! Reference source not found.**). La concentration en îlots est approximativement de  $10^4$  îlots/ml d'alginate. La solution d'acétate de calcium est préparée selon le protocole de broyage avec de l'huile de soja hyper-raffinée de chez Croda (procédé 2).

Les conditions de pré-gélification utilisées sont celles optimisées au cours du chapitre IV pour un fonctionnement de transfert optimal : une concentration d'acétate de calcium broyé de 3% (w/w) avec un temps de pré-gélification de 15 s.

#### VI.2.1.2.1. Déroulement de l'encapsulation des îlots de Langerhans

Durant les expériences d'encapsulation, nous retrouvons les problèmes de mouillage des dispositifs observés pour la manipulation de cellules dans de l'alginate (cf. **Error! Reference source not found.**). Pour limiter ce phénomène, la pression d'alginate est laissée assez basse  $P_{\text{alginate}} = 470$  mbar. Les pressions utilisées correspondent à celles utilisées pour avoir une pré-gélification de 15 s,  $P_{\text{huile}} = P_{\text{acétate}} = 500$  mbar et  $P_{\text{calcium}} = 450$  mbar.

L'encapsulation des îlots humains avec le premier module est représentée sur la séquence d'images Figure 124. Après une vingtaine de minutes d'utilisation de la puce, le phénomène de mouillage apparaît et empêche de continuer l'expérience (Figure 125). Une autre conséquence est une adhésion plus forte des gouttes pré-gélifiées ou des capsules sur la surface de la puce. Il arrive donc plus fréquemment que les capsules restent bloquées lors du procédé d'encapsulation, par exemple au niveau du transfert de phase (Figure 125-b).

## Chapitre VI : Vers l'implantation: caractérisation des capsules et biocompatibilité des procédés d'encapsulation

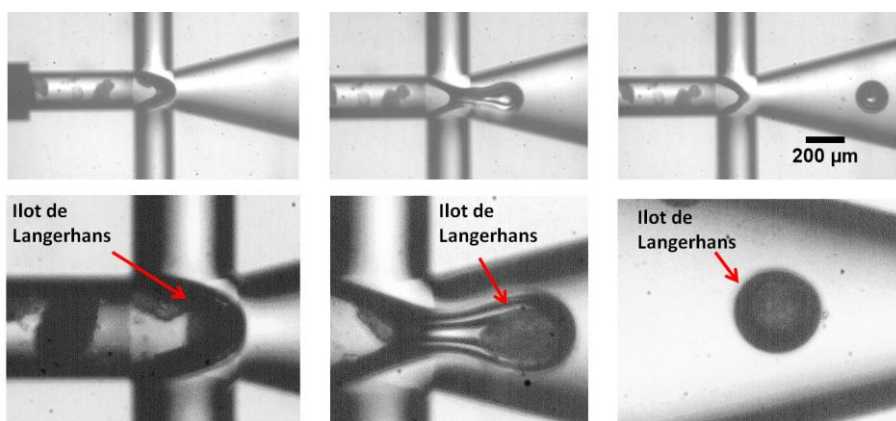


Figure 124 – Encapsulation d'îlots de Langerhans par le premier module de production de gouttes.

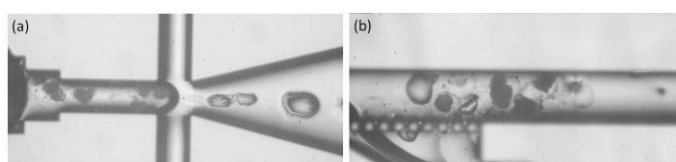


Figure 125 – a) Phénomène de mouillage apparu après 20 minutes de fonctionnement, b) Adhésion accrue des capsules formées en présence de cellules.

L'arrivée d'une goutte pré-gélifiée au niveau du module de transfert est présentée sur la séquence d'images Figure 126. Cette séquence a pu être réalisée en caméra rapide, ce qui n'avait pas pu être fait pour l'expérience décrite auparavant avec les cellules Jurkat. Tout comme dans le chapitre V, une déformation se produit lors de la phase d'approche de l'interface. Pourtant, ce type de déformation n'avait jamais été observé pour un montage avec une connectique par la tranche.

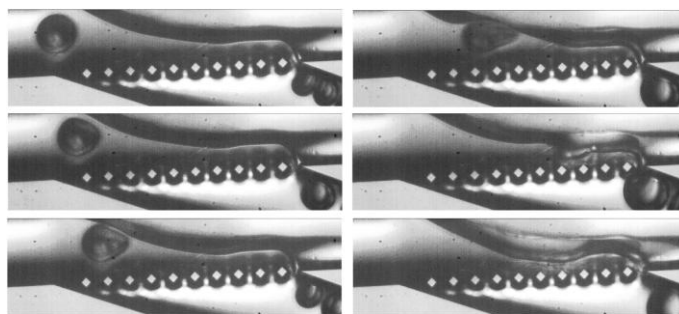


Figure 126 – Transfert d'une goutte pré-gélifiée avec îlot (temps entre les images : 4,4ms).

Avec les mêmes conditions de pré-gélification (concentration d'acétate de calcium et temps de pré-gélification) et les mêmes pressions de fonctionnement que celles optimisées dans le chapitre IV, une déformation apparaît.

Notre hypothèse sur cette déformation est la suivante. Pour le montage en carte fluïdique à 3 étages (chapitre V), cette déformation en forme de « bec » a été expliquée comme étant provoquée par une différence de pression trop importante entre le flux d'huile et le flux de calcium dans la chambre de transfert ( $\Delta P \geq 100$  mbar). Les gouttes formées avec l'alginate en présence d'îlots semblent donc plus sensibles à la différence de pression et se déforment à l'approche de l'interface même pour une différence de pression faible (valeur théorique  $\Delta P_{OUT} = 51,7$  mbar et  $\Delta P_{IN} = 33,2$  mbar).

## Chapitre VI : Vers l'implantation: caractérisation des capsules et biocompatibilité des procédés d'encapsulation

Cette sensibilité à un  $\Delta P$  plus faible s'explique, peut-être, par une homogénéisation insuffisante de la solution d'alginate de départ avec les îlots. En effet, 50  $\mu\text{l}$  de solution tampon contenant les îlots sont mis en suspension dans 500  $\mu\text{l}$  d'alginate, l'homogénéisation est simplement réalisée par des allers-retours successifs avec une pipette. Avec cette méthode, il est donc difficile d'homogénéiser correctement cette solution très visqueuse ( $\sim 4500 \text{ mPa.s}$ ) sans exposer les îlots à un fort cisaillement, qui pourrait affecter leur viabilité. Ainsi, à l'approche de l'interface, l'eau mal répartie dans l'alginate formant la goutte, est peut-être plus facilement déformable.

La deuxième hypothèse est que la présence de cellules modifie chimiquement la pré-gélification par les cristaux d'acétate de calcium. La goutte, qui arrive au niveau de transfert de phase, ne serait pas assez pré-gélifiée et pourrait ainsi plus facilement se déformer.

### VI.2.1.2.2. *Allure des capsules obtenues*

Tout comme pour les expériences précédentes avec les Jurkat, l'aspect des capsules n'est pas bon. Les capsules obtenues sont déformées et la pré-gélification donne une surface très irrégulière et « cabossée » (Figure 127). Sans cellule, même si une légère irrégularité était visible au microscope, les capsules obtenues étaient bien plus sphériques. Cela peut être expliqué par la déformation subie par les capsules à l'approche de l'interface. D'autre part, l'hypothèse d'une mauvaise homogénéisation de l'alginate pourrait, peut-être, aussi expliquer l'augmentation d'irrégularités de surface en présence de cellules. La pré-gélification se fait a priori localement par des impacts des cristaux d'acétate de calcium sur la surface de la goutte d'alginate. Le fait que la goutte n'est pas une répartition bien homogène du polymère accentue certainement la rugosité finale des capsules.

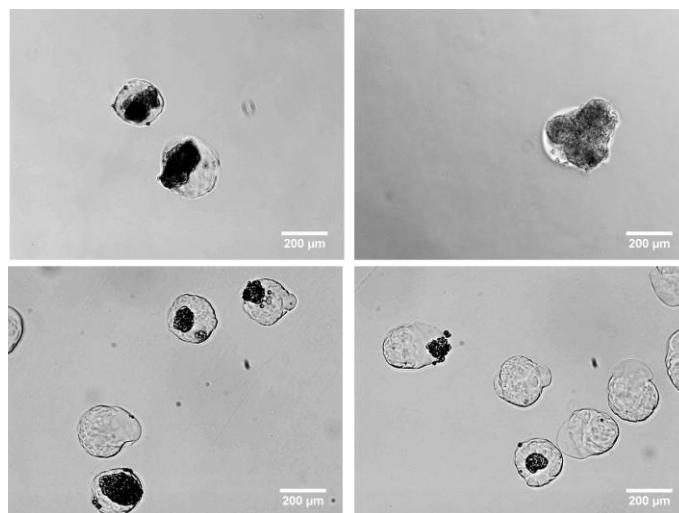


Figure 127 – Aspect des îlots humains encapsulés avec le système à 2 étages.

Malgré les défauts de surface et l'aspect des capsules, la viabilité a tout de même été évaluée pour ce procédé de gélification optimisé au chapitre IV.

### VI.2.1.2.3. *Etude de viabilité sur le procédé optimisé*

Le nombre d'îlots encapsulés permet d'analyser une trentaine d'îlots sur trois jours. Le suivi de la viabilité a été fait deux jours puis 6 jours après encapsulation (Figure 128). Les îlots considérés viables ont plus de 50% de leurs cellules vivantes.

## Chapitre VI : Vers l'implantation: caractérisation des capsules et biocompatibilité des procédés d'encapsulation

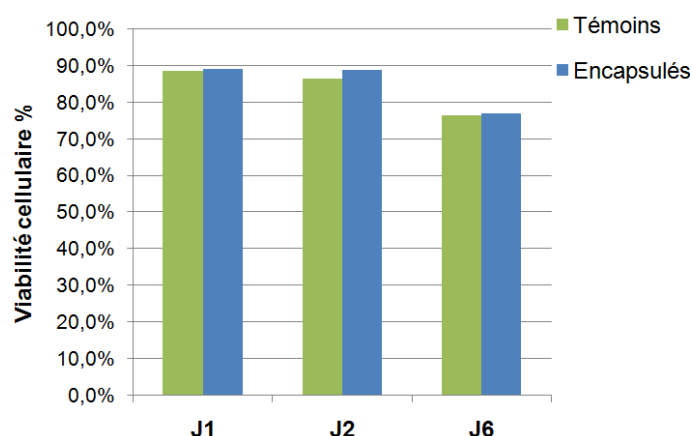


Figure 128 – Viabilité des îlots de Langerhans encapsulés avec transfert de phase automatisé.

Après 6 jours d'encapsulation, il n'y a pas d'influence visible du protocole d'encapsulation sur la viabilité des cellules pour un pourcentage d'acétate de calcium de 3% (w/w) et un temps de pré-gélification de 15 s. Cela démontre, tout comme pour les cellules Jurkat, l'atout de l'évacuation de l'agent gélifiant après pré-gélification grâce au transfert de phase.

**Ces résultats sont les tous premiers essais d'encapsulation d'îlots humains avec un procédé de transfert automatisé en phase gélifiante. Ils ne montrent apparemment pas de toxicité pour une exposition à une concentration d'acétate de calcium à 3% (w/w) pendant un temps de pré-gélification de 15s. Des expériences doivent être reconduites pour confirmer ces résultats préliminaires encourageants.**

### VI.3 PREMIERS ESSAIS D'IMPLANTATION CHEZ DES SOURIS

Dans le cadre de ce projet de thèse, nous avons eu l'opportunité, grâce à la collaboration avec l'équipe du Pr J. Oberholzer, de réaliser un premier essai préclinique chez le rongeur. Les capsules implantées sont issues de la carte fluidique à trois étages avec le protocole automatisé. Les capsules implantées sont vides, l'optique étant d'abord de tester la biocompatibilité du matériau seul.

#### VI.3.1.1. PREPARATION DES CAPSULES

Les solutions sont stérilisées et le banc expérimental est préparé de la même façon que pour une expérience d'encapsulation de cellules (cf. II.3). 25 cartes fluidiques ont été réalisées puis stérilisées par exposition aux UV pendant 30 min.

Les capsules ont été réalisées avec de l'alginate à 3% (l/w). Les conditions de pré-gélification sont les mêmes que celles optimisées dans le chapitre V : une concentration en acétate de calcium de 3% (w/w) avec un temps de pré-gélification de 30s. Le temps de gélification, fixé par les pressions, est de 30 s. Les pressions utilisées sont  $P_{\text{huile}}=P_{\text{acétate}}=350$  mbar,  $P_{\text{alginate}} = 315$  mbar,  $P_{\text{calcium}}=300$  mbar,  $P_{\text{sérum}} = 250$  mbar. Pour ces expériences, il a fallu fonctionner à basse fréquence ( $\leq 45$  gouttes/min). En effet, ce lot de cartes a présenté un problème de fonctionnalisation de surface, les gouttes et les capsules ont donc eu tendance à accrocher et à bloquer le système plus fréquemment que d'habitude. 500 à 2000 capsules ont été produites par carte fluidique. En tout, 26 000 capsules ont pu être réalisées en 1 semaine.

## Chapitre VI : Vers l'implantation: caractérisation des capsules et biocompatibilité des procédés d'encapsulation

---

### VI.3.1.2. RESULTATS D'IMPLANTATION

Ces 26 000 capsules ont été envoyées dans le laboratoire de J. Oberholzer pour réaliser l'implantation chez des souris. 6 souris ont reçu des capsules, 3 souris Balb/c et 3 souris C57. Deux races de souris ont été implantées afin d'avoir la réaction de deux systèmes immunitaires différents. Le temps d'implantation a été fixé à 4 semaines. La biocompatibilité est estimée en fonction de la quantité de fibrose formée autour des capsules après implantation. Les capsules sont classées en 4 catégories, en fonction du taux de recouvrement par les cellules. Ce taux est associé à des scores: 0% de recouvrement = 0, 0-25% de recouvrement = 1, 25-50% de recouvrement = 2, 50-75% de recouvrement = 3, 75-100% de recouvrement = 4. Les capsules avec une bonne biocompatibilité ont un score de 0, celles avec une importante formation de fibrose ont un score de 4. Les résultats sont comparés à ceux de capsules réalisées par l'équipe de Chicago avec une technique classique macroscopique (concentration d'alginate de 1,8% et une gélification en bain de calcium/baryum).

Les capsules récupérées après ces 4 semaines ne sont pas dissoutes et ne présentent pas de fissures. Sans ion baryum avec une forte concentration d'alginate, les capsules résistent tout de même à la pression osmotique. C'est le premier point positif de cet essai chez la souris.

Les différences de biocompatibilité entre les capsules issues de la carte fluide et celles de Chicago sont visibles (Figure 129). Alors que la réaction est comparable pour les souris C57, les capsules réalisées par la carte induisent une forte réaction chez la souris Balb/c. Or, cette souris ne présente pas de réaction envers les capsules de Chicago. Les résultats de biocompatibilité sont donc mitigés, mais plusieurs remarques peuvent être faites :

- Les capsules sont tellement petites ( $175\mu\text{m} \pm 1,9\%$ ) qu'elles sont difficilement visibles et seulement 100 capsules/souris ont pu être récupérées, sur les 4000 capsules implantées au départ. La question est de savoir si les capsules récupérées sont bien représentatives de l'ensemble des capsules implantées. Il est difficile de dire si les capsules non trouvées n'ont pas été récupérées car elles sont totalement recouvertes de fibroses ou bien s'ils elles n'étaient tout simplement pas visibles.
- L'autre point à confirmer est que les capsules ont été implantées chez des souris vieilles de 5 à 6 mois. Les résultats des capsules de Chicago avaient été obtenus après implantation chez des souris plus jeunes (de quelques semaines). Des expériences sont en cours pour s'assurer que l'âge de la souris ne joue pas sur la réaction immunitaire envers les capsules. Cependant, cette réaction immunitaire forte chez la souris Balb/c est certainement due à la surface des capsules beaucoup plus rugueuse pour le procédé de gélification avec les cristaux d'acétate de calcium que pour une gélification externe. La rugosité facilite l'adhésion des cellules du système immunitaire sur la surface.

**Après discussion avec nos partenaires, pour les prochaines implantations, il faudra fournir 10 fois plus de capsules afin d'en analyser un plus grand nombre après implantation. Cependant, fournir autant de capsules ne sera possible qu'après une amélioration de la carte fluide afin de pouvoir monter en fréquence. D'autre part, il serait intéressant d'implanter des capsules de 500  $\mu\text{m}$  issues d'une carte fluide similaire, pour être réellement comparable aux capsules réalisées par les techniques classiques. Des puces sont en cours de réalisation pour pouvoir les produire.**

## Chapitre VI : Vers l'implantation: caractérisation des capsules et biocompatibilité des procédés d'encapsulation

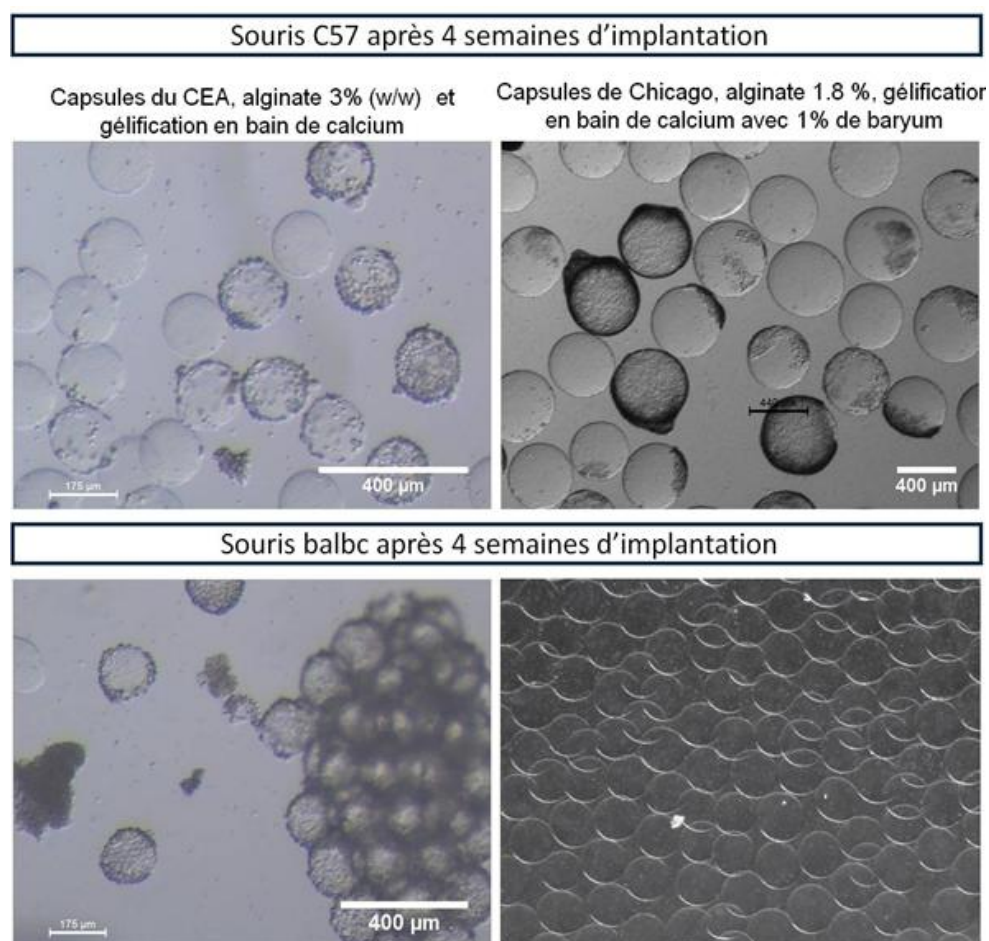


Figure 129 – Capsules récupérées après 4 semaines d'implantation chez la souris.

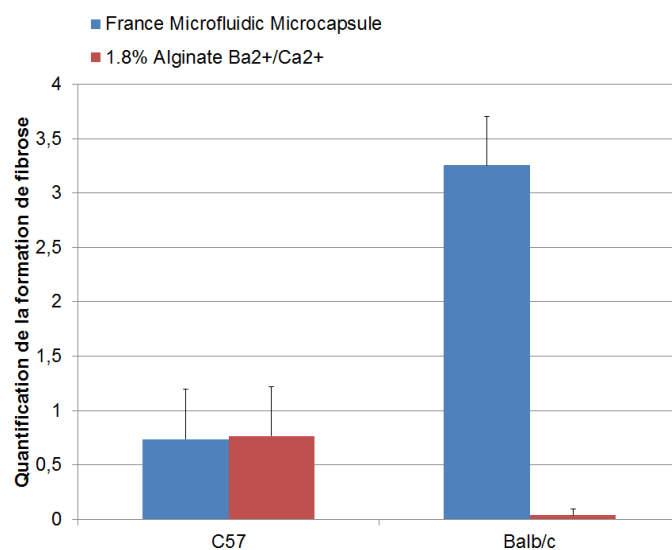


Figure 130 - Quantification de la réaction immunitaire envers les capsules.



## Chapitre VI : Vers l'implantation: caractérisation des capsules et biocompatibilité des procédés d'encapsulation

---

### VI.4 DISCUSSION ET CONCLUSION

Plusieurs points positifs sont à retenir des travaux présentés dans ce chapitre :

- ❖ Le procédé d'encapsulation automatisé en carte fluidique donne des lots de capsules plus reproductibles que ceux réalisés avec des procédés de fabrication manuels (III.3.2.4.2).
- ❖ Les tests sur cellules réalisés sur un montage avec un transfert en calcium automatisé ont donné de bons résultats de viabilité. Le procédé de gélification développé avec une étape de pré-gélification par cristaux d'acétate de calcium n'est pas toxique avec une exposition limitée au seul temps de pré-gélification.

Le module pourra donc être employé pour d'autres procédés de pré-gélification avec des agents gélifiants potentiellement toxiques en exposition prolongée, en limitant leur contact avec les cellules à un temps de pré-gélification adapté.

- ❖ Les premiers résultats d'implantation sont encourageants et à reconduire.

Cependant, de nombreux points concernant le système et le procédé de gélification employé sont à améliorer :

- ❖ La manipulation de cellules change les résultats obtenus sur la sphéricité et la rugosité des capsules. De plus, nous rappelons que la manipulation de cellules change également le comportement fluidique en microsystème (**Error! Reference source not found.**). La formation d'une émulsion monodisperses est plus difficile et le temps d'utilisation des microsystèmes est écourté. Des investigations doivent être réalisées pour améliorer la surface du système fluidique (fonctionnalisation et rugosité).
- ❖ Même sans cellule, les premiers résultats d'observation au microscope électronique à balayage ont montrés une très forte rugosité des capsules, ce qui est un point négatif dans l'optique d'une implantation.

---

## CONCLUSION

---





## ***Bilan sur le cahier des charges initial***

Au cours de ce projet de recherche, nous avons mis au point un consommable microfluidique qui automatise le procédé d'encapsulation monocouche de cellules dans de l'alginate. Dans cette conclusion, nous résumons l'avancée actuelle du système sur les différents points du cahier des charges présenté en introduction.

- Monodispersité et sphéricité.

Le chapitre III a présenté le procédé de pré-gélification des gouttes d'alginate. Ce procédé permet d'éviter la déformation des gouttes au travers de l'interface huile/calcium observée pour une gélification simple externe. Deux procédés de broyage, par ultrasons à 0,35% (w/w) et colloïdal à 2% (w/w), ont été optimisés en fonction de la taille des cristaux en suspension dans l'huile, de la concentration ainsi que du temps de contact avec l'alginate. Il a été démontré que ces paramètres influencent la sphéricité des capsules obtenues. Pour ces deux procédés, les capsules obtenues sont monodisperses ( $CV \leq 2\%$ ).

Au cours du chapitre IV, pour un procédé de pré-gélification donné, nous avons sélectionné les meilleures géométries de transfert de phase, afin de préserver la sphéricité des capsules. Les puces avec déflecteur se sont révélées être les puces les plus performantes. Des améliorations géométriques ont été proposées pour de futures puces.

Le chapitre V relate les développements menés pour l'intégration et l'automatisation du procédé complet d'encapsulation monocouche. Le passage en carte fluidique avec une nouvelle connectique a induit des changements conséquents. Il a donc fallu réaliser plusieurs ajustements (canal de pré-gélification en serpentins et résistances hydrauliques) afin de retrouver le fonctionnement du transfert de phase présenté dans le chapitre IV, ainsi que les performances en termes de sphéricité. Ces premiers essais en carte fluidique ont démontré la faisabilité d'un tel système tout en préservant la sphéricité des capsules.

Malgré ces avancées, il est important de moduler les résultats obtenus. Les surfaces des capsules, qui ont été observées au microscope puis au MEB, se sont montrées rugueuses et inhomogènes. Des investigations doivent être menées pour développer des solutions alternatives de pré-gélification.

- Toxicité du procédé de gélification sur les cellules.

Dans le chapitre III, il a été démontré que la concentration et le temps de contact des cellules avec l'acétate de calcium devaient être réduits au maximum car une forte concentration s'est révélée toxique durant une exposition prolongée. Ces résultats démontrent l'intérêt du transfert de phase permettant de réduire le temps de contact avec l'agent gélifiant.

Cela a été vérifié sur la lignée de cellules Jurkat et avec un premier essai sur des îlots humains. Limité à un temps de pré-gélification  $\leq 30$  s et jusqu'à une concentration de 3% (w/w), l'acétate de calcium n'est pas toxique. Le procédé de pré-gélification a été donc validé du point de vue de la viabilité cellulaire.

Cependant, la manipulation de cellules impose des difficultés supplémentaires. La fonctionnalisation de surface utilisée n'est pas suffisante. Nous nous sommes heurtés à plusieurs reprises à des phénomènes de mouillage de l'alginate sur le silicium, empêchant ainsi la formation de l'émulsion. L'autre conséquence est que l'adhésion des gouttes et des capsules en présence de cellules est beaucoup plus forte et augmente le risque de blocage dans les lignes fluidiques. Des investigations doivent être menées pour améliorer la fonctionnalisation de surface des canaux afin d'éviter ce phénomène.

## Conclusion

---

- Propreté du lot de capsules produit.

Au cours du chapitre IV, des géométries de transfert de phase ont été sélectionnées en fonction de leur stabilisation de l'interface. En effet, cette stabilisation est importante pour éviter au maximum la pollution en huile de la solution de récupération des capsules. Les expressions théoriques des pressions dans la chambre de transfert ont également permis de comprendre de façon plus précise les paramètres jouant sur le positionnement de l'interface et sur sa stabilité.

La carte fluidique présentée au chapitre V a montré une capacité à limiter la pollution en huile du flux sérum, en piégeant les gouttes d'huile résiduelles dans le canal de gélification.

Cependant, une fonctionnalisation localisée hydrophile pour le canal de calcium dans la chambre de transfert est une possibilité à envisager. Cela permettrait peut-être de réduire encore le risque de pollution, en évitant toute remontée d'huile sur les canaux de la phase de calcium.

- Récupération à concentration physiologique.

Les premiers dosages de calcium réalisés après le second transfert, montrent une concentration en calcium trop élevée ( $>10\text{mM}$  pour une concentration visée à  $2\text{mM}$ ). Des optimisations sur les pressions des flux de calcium et de sérum dans cette chambre ainsi que sur la géométrie de ce transfert seront à réaliser.

**Confidentiel**

## ***Perspectives***

L'intérêt d'un système automatisé pour la fabrication des capsules a commencé à être démontré au travers des caractérisations mécaniques. En effet, les écarts-type de mesures sont beaucoup plus réduits lorsque les capsules sont produites par la carte fluidique à 3 étages. Les futures investigations doivent donc valider cet apport sur des tests d'implantation.

A l'issue de deux thèses consécutives, une première preuve de concept du projet CELLENC® a été réalisée. Nous avons démontré la possibilité d'automatiser un procédé d'encapsulation monocouche avec le polymère le plus utilisé, l'alginate. Un premier test d'implantation sur rongeur a pu être réalisé avec l'équipe du Pr J. Oberholzer à Chicago. Les premiers résultats sont encourageants et ouvrent de belles perspectives de collaboration. A notre connaissance, une telle avancée n'a pas encore été reportée. Actuellement, le projet continue et commence à prendre de l'ampleur puisque des projets européens sont en cours d'élaboration.



---

## BIBLIOGRAPHIE

---



## Bibliographie

---

- [1] « OMS|Diabète », *WHO* [Online] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/fr/index.html>. [Accessed: 15-oct-2012].
- [2] P. de Vos, M. M. Faas, B. Strand, et R. Calafiore, « Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets », *Biomaterials*, vol. 27, n°. 32, p. 5603-5617, nov. 2006.
- [3] J. C. Pickup et E. Renard, « Long-acting insulin analogs versus insulin pump therapy for the treatment of type 1 and type 2 diabetes », *Diabetes Care*, vol. 31 Suppl 2, p. S140-145, févr. 2008.
- [4] L. Ratheau, N. Jeandidier, F. Moreau, S. Sigrist, et M. Pinget, « How technology has changed diabetes management and what it has failed to achieve », *Diabetes & Metabolism*, vol. 37, Supplement 4, n°. 0, p. S57-S64, déc. 2011.
- [5] E. A. Ryan, J. R. T. Lakey, R. V. Rajotte, G. S. Korbutt, T. Kin, S. Imes, A. Rabinovitch, J. F. Elliott, D. Bigam, N. M. Kneteman, G. L. Warnock, I. Larsen, et A. M. J. Shapiro, « Clinical Outcomes and Insulin Secretion After Islet Transplantation With the Edmonton Protocol », *Diabetes*, vol. 50, n°. 4, p. 710-719, janv. 2001.
- [6] E. A. Ryan, B. W. Paty, P. A. Senior, D. Bigam, E. Alfadhli, N. M. Kneteman, J. R. T. Lakey, et A. M. J. Shapiro, « Five-year follow-up after clinical islet transplantation », *Diabetes*, vol. 54, n°. 7, p. 2060-2069, 2005.
- [7] M.-C. Vantyghem, J. Kerr-Conte, L. Arnalsteen, G. Sergent, F. Defrance, V. Gmyr, N. Declerck, V. Raverdy, B. Vandewalle, P. Pigny, C. Noel, et F. Pattou, « Primary Graft Function, Metabolic Control, and Graft Survival After Islet Transplantation », *Diabetes Care*, vol. 32, n°. 8, p. 1473-1478, janv. 2009.
- [8] N. Sakata, « Encapsulated islets transplantation: Past, present and future », *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, vol. 3, n°. 1, p. 19, 2012.
- [9] F. B. Barton, M. R. Rickels, R. Alejandro, B. J. Hering, S. Wease, B. Naziruddin, J. Oberholzer, J. S. Odorico, M. R. Garfinkel, M. Levy, F. Pattou, T. Berney, A. Secchi, S. Messinger, P. A. Senior, P. Maffi, A. Posselt, P. G. Stock, D. B. Kaufman, X. Luo, F. Kandeel, E. Cagliero, N. A. Turgeon, P. Witkowski, A. Naji, P. J. O'Connell, C. Greenbaum, Y. C. Kudva, K. L. Brayman, M. J. Aull, C. Larsen, T. W. H. Kay, L. A. Fernandez, M.-C. Vantyghem, M. Bellin, et A. M. J. Shapiro, « Improvement in Outcomes of Clinical Islet Transplantation: 1999-2010 », *Diabetes Care*, vol. 35, n°. 7, p. 1436-1445, juill. 2012.
- [10] I. Penn, « Post-transplant malignancy: the role of immunosuppression », *Drug Saf*, vol. 23, n°. 2, p. 101-113, août 2000.
- [11] A. M. J. Shapiro, J. R. T. Lakey, E. A. Ryan, G. S. Korbutt, E. Toth, G. L. Warnock, N. M. Kneteman, et R. V. Rajotte, « Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen », *New England Journal of Medicine*, vol. 343, n°. 4, p. 230-238, 2000.
- [12] H. Noguchi, B. Naziruddin, A. Jackson, M. Shimoda, T. Ikemoto, Y. Fujita, D. Chujo, M. Takita, N. Kobayashi, N. Onaca, M. F. Levy, et S. Matsumoto, « Low-temperature preservation of isolated islets is superior to conventional islet culture before islet transplantation », *Transplantation*, vol. 89, n°. 1, p. 47-54, 2010.
- [13] K. A. D'Amour, A. G. Bang, S. Eliazar, O. G. Kelly, A. D. Agulnick, N. G. Smart, M. A. Moorman, E. Kroon, M. K. Carpenter, et E. E. Baetge, « Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells », *Nature Biotechnology*, vol. 24, n°. 11, p. 1392-1401, 2006.

## Bibliographie

---

- [14] S. Chen, M. Borowiak, J. L. Fox, R. Maehr, K. Osafune, L. Davidow, K. Lam, L. F. Peng, S. L. Schreiber, L. L. Rubin, et D. Melton, « A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage », *Nature Chemical Biology*, vol. 5, n°. 4, p. 258-265, 2009.
- [15] S. Bonner-Weir, M. Taneja, G. C. Weir, K. Tatarkiewicz, K. H. Song, A. Sharma, et J. J. O'Neil, « In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 97, n°. 14, p. 7999-8004, juill. 2000.
- [16] R. S. Boneva et T. M. Folks, « Xenotransplantation and risks of zoonotic infections », *Ann. Med.*, vol. 36, n°. 7, p. 504-517, 2004.
- [17] T. M. S. Chang, « Semipermeable Microcapsules », *Science*, vol. 146, n°. 3643, p. 524-525, oct. 1964.
- [18] F. Lim et A. Sun, « Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. », *Science*, vol. 210, n°. 4472, p. 908-910, 1980.
- [19] G. Orive, R. M. Hernández, A. Rodríguez Gascón, R. Calafiore, T. M. S. Chang, P. de Vos, G. Hortelano, D. Hunkeler, I. Lacík, et J. L. Pedraz, « History, challenges and perspectives of cell microencapsulation », *Trends Biotechnol.*, vol. 22, n°. 2, p. 87-92, févr. 2004.
- [20] A. Murua, A. Portero, G. Orive, R. M. Hernández, M. de Castro, et J. L. Pedraz, « Cell microencapsulation technology: Towards clinical application », *Journal of Controlled Release*, vol. 132, n°. 2, p. 76-83, déc. 2008.
- [21] E. S. O'Sullivan, A. Vegas, D. G. Anderson, et G. C. Weir, « Islets transplanted in immunoisolation devices: a review of the progress and the challenges that remain », *Endocr. Rev.*, vol. 32, n°. 6, p. 827-844, déc. 2011.
- [22] A. King, « Microencapsulation of islets of Langerhans: impact of cellular overgrowth, Upsala Journal of Medical Sciences, Informa Healthcare », *Upsala J Med*, p. 161-174, 2011.
- [23] « Gopubmed »: [www.gopubmed.com](http://www.gopubmed.com).
- [24] N. V. Krishnamurthy et B. Gimi, « Encapsulated cell grafts to treat cellular deficiencies and dysfunction », *Crit Rev Biomed Eng*, vol. 39, n°. 6, p. 473-491, 2011.
- [25] A. P. Monaco, T. Maki, H. Ozato, M. Carretta, S. J. Sullivan, K. M. Borland, M. D. Mahoney, W. L. Chick, T. E. Muller, et J. Wolfrum, « Transplantation of islet allografts and xenografts in totally pancreatectomized diabetic dogs using the hybrid artificial pancreas », *Ann. Surg.*, vol. 214, n°. 3, p. 339-360; discussion 361-362, sept. 1991.
- [26] H. Hayashi, K. Inoue, T. Aung, T. Tun, G. Yuanjun, W. Wenjing, S. Shinohara, H. Kaji, R. Doi, H. Setoyama, M. Kato, M. Imamura, S. Maetani, N. Morikawa, H. Iwata, Y. Ikada, et J. Miyazaki, « Application of a novel B cell line MIN6 to a mesh-reinforced polyvinyl alcohol hydrogel tube and three-layer agarose microcapsules: an in vitro study », *Cell Transplant*, vol. 5, n°. 5 Suppl 1, p. S65-69, oct. 1996.
- [27] J. I. Lee, R. Nishimura, H. Sakai, N. Sasaki, et T. Kenmochi, « A newly developed immunoisolated bioartificial pancreas with cell sheet engineering », *Cell Transplant*, vol. 17, n°. 1-2, p. 51-59, 2008.
- [28] H. Uludag, P. De Vos, et P. A. Tresco, « Technology of mammalian cell encapsulation », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 42, n°. 1-2, p. 29-64, août 2000.
- [29] K. A. Heel et J. C. Hall, « Peritoneal defences and peritoneum-associated lymphoid tissue », *Br J Surg*, vol. 83, n°. 8, p. 1031-1036, août 1996.



## Bibliographie

---

- [30] K. Suzuki, S. Bonner-Weir, J. Hollister-Lock, C. K. Colton, et G. C. Weir, « Number and Volume of Islets Transplanted in Immunobarrier Devices », *Cell Transplantation*, vol. 7, n<sup>o</sup>. 1, p. 47-52, janv. 1998.
- [31] K. Suzuki, S. Bonner-Weir, N. Trivedi, K. H. Yoon, J. Hollister-Lock, C. K. Colton, et G. C. Weir, « Function and survival of macroencapsulated syngeneic islets transplanted into streptozocin-diabetic mice », *Transplantation*, vol. 66, n<sup>o</sup>. 1, p. 21-28, juill. 1998.
- [32] S. Sigrist, A. Mechine-Neuville, K. Mandes, V. Calenda, S. Braun, G. Legeay, J. P. Bellocq, A. Pinget, et L. Kessler, « Influence of VEGF on the viability of encapsulated pancreatic rat islets after transplantation in diabetic mice », *Cell Transplant.*, vol. 12, n<sup>o</sup>. 6, p. 627-635, 2003.
- [33] « <http://defymed.com/> ».
- [34] D. Chicheportiche et G. Reach, « In vitro kinetics of insulin release by microencapsulated rat islets: effect of the size of the microcapsules », *Diabetologia*, vol. 31, n<sup>o</sup>. 1, p. 54-57, janv. 1988.
- [35] M. Spector, C. Cease, et T. Xia, « The Local Tissue-Response to Biomaterials », *Critical Reviews in Biocompatibility*, vol. 5, n<sup>o</sup>. 3, p. 269-295, 1989.
- [36] F. A. Leblond, G. Simard, N. Henley, B. Rocheleau, P. M. Huet, et J. P. Halle, « Studies on smaller (similar to 315  $\mu$  M) microcapsules: IV. Feasibility and safety of intrahepatic implantations of small alginate poly-L-lysine microcapsules », *Cell Transplant.*, vol. 8, n<sup>o</sup>. 3, p. 327-337, juin 1999.
- [37] M. de Groot, T. A. Schuurs, et R. van Schilfgaarde, « Causes of limited survival of microencapsulated pancreatic islet grafts », *Journal of Surgical Research*, vol. 121, n<sup>o</sup>. 1, p. 141-150, sept. 2004.
- [38] S. Krol, S. del Guerra, M. Grupillo, A. Diaspro, A. Gliozzi, et P. Marchetti, « Multilayer nanoencapsulation. New approach for immune protection of human pancreatic islets », *Nano Lett.*, vol. 6, n<sup>o</sup>. 9, p. 1933-1939, sept. 2006.
- [39] Z.-I. Zhi, A. Kerby, A. J. F. King, P. M. Jones, et J. C. Pickup, « Nano-scale encapsulation enhances allograft survival and function of islets transplanted in a mouse model of diabetes », *Diabetologia*, vol. 55, n<sup>o</sup>. 4, p. 1081-1090, avr. 2012.
- [40] Y. Teramura et H. Iwata, « Bioartificial pancreas: Microencapsulation and conformal coating of islet of Langerhans », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 62, n<sup>o</sup>. 7-8, p. 827-840, juin 2010.
- [41] W. M. Fritschy, P. de Vos, H. Groen, F. A. Klatter, A. Pasma, G. H. Wolters, et R. van Schilfgaarde, « The capsular overgrowth on microencapsulated pancreatic islet grafts in streptozotocin and autoimmune diabetic rats », *Transpl. Int.*, vol. 7, n<sup>o</sup>. 4, p. 264-271, juill. 1994.
- [42] S. A. Safley, H. Cui, S. Cauffiel, C. Tucker-Burden, et C. J. Weber, « Biocompatibility and Immune Acceptance of Adult Porcine Islets Transplanted Intraperitoneally in Diabetic NOD Mice in Calcium Alginate Poly-L-lysine Microcapsules versus Barium Alginate Microcapsules without Poly-L-lysine », *J Diabetes Sci Technol*, vol. 2, n<sup>o</sup>. 5, p. 760-767, sept. 2008.
- [43] P. De Vos, J. F. M. Van Straaten, A. G. Nieuwenhuizen, M. de Groot, R. J. Ploeg, P. J. De Haan, et R. Van Schilfgaarde, « Why do microencapsulated islet grafts fail in the absence of fibrotic overgrowth? », *Diabetes*, vol. 48, n<sup>o</sup>. 7, p. 1381-1388, juill. 1999.
- [44] A. I. Silva, A. N. de Matos, I. G. Brons, et M. Mateus, « An overview on the development of a bio-artificial pancreas as a treatment of insulin-dependent diabetes mellitus », *Med Res Rev*, vol. 26, n<sup>o</sup>. 2, p. 181-222, mars 2006.

## Bibliographie

---

- [45] M. Ricci, P. Blasi, S. Giovagnoli, C. Rossi, G. Macchiarulo, G. Luca, G. Basta, et R. Calafiore, « Ketoprofen controlled release from composite microcapsules for cell encapsulation: effect on post-transplant acute inflammation », *J Control Release*, vol. 107, n<sup>o</sup>. 3, p. 395-407, oct. 2005.
- [46] L. Baruch, O. Benny, A. Gilert, M. Ukobnik, O. Ben Itzhak, et M. Machluf, « Alginate-PLL cell encapsulation system Co-entrapping PLGA-microspheres for the continuous release of anti-inflammatory drugs », *Biomedical Microdevices*, vol. 11, n<sup>o</sup>. 5, p. 1103-1113, juin 2009.
- [47] P. de Vos, M. Bucko, P. Gemeiner, M. Navratil, J. Svitel, M. Faas, B. L. Strand, G. Skjak-Braek, Y. A. Mørch, A. Vikartovska, I. Lacik, G. Kollarikova, G. Orive, D. Poncelet, J. L. Pedraz, et M. B. Ansorge-Schumacher, « Multiscale requirements for bioencapsulation in medicine and biotechnology », *Biomaterials*, vol. 30, n<sup>o</sup>. 13, p. 2559-2570, mai 2009.
- [48] O. Smidsrød et G. Skjåk-Bræk, « Alginate as immobilization matrix for cells », *Trends in Biotechnology*, vol. 8, n<sup>o</sup>. 0, p. 71-78, 1990.
- [49] K. Y. Lee et D. J. Mooney, « Alginate: Properties and biomedical applications », *Progress in Polymer Science*, vol. 37, n<sup>o</sup>. 1, p. 106-126, janv. 2012.
- [50] B. L. Strand, Y. A. Mørch, et G. Skjåk-Bræk, « Alginate as immobilization matrix for cells », *Minerva Biotechnologica*, vol. 12, n<sup>o</sup>. 4, p. 223-233, 2000.
- [51] Grasdalen, H., Bjorn, L., et O. Smidsrød, « A P.M.R study of the composition and sequence of uronate residues in alginates », *Carbohydrate Research*, p. 23-31, 1979.
- [52] Grasdalen, H., « High-field, H-n.m.r spectroscopy of alginate : sequential structure and linkage conformations », p. 255-260, 1983.
- [53] B. Thu, P. Bruheim, T. Espevik, O. Smidsrød, P. Soon-Shiong, et G. Skjåk-Braek, « Alginate polycation microcapsules. I. Interaction between alginate and polycation », *Biomaterials*, vol. 17, n<sup>o</sup>. 10, p. 1031-1040, mai 1996.
- [54] P. Sikorski, F. Mo, G. Skjåk-Bræk, et B. T. Stokke, « Evidence for Egg-Box-Compatible Interactions in Calcium-Alginate Gels from Fiber X-ray Diffraction », *Biomacromolecules*, vol. 8, n<sup>o</sup>. 7, p. 2098-2103, juill. 2007.
- [55] I. Lacik, « Polymer chemistry in diabetes treatment by encapsulated islets of Langerhans: Review to 2006 », *Aust. J. Chem.*, vol. 59, n<sup>o</sup>. 8, p. 508-524, 2006.
- [56] P. Flory, « Statistical mechanics of swelling of network structures », *The journal of chemical physics*, 1950.
- [57] B. Thu, P. Bruheim, T. Espevik, O. Smidsrød, P. Soon-Shiong, et G. Skjak-Braek, « Alginate polycation microcapsules .2. Some functional properties », *Biomaterials*, vol. 17, n<sup>o</sup>. 11, p. 1069-1079, juin 1996.
- [58] A. Martinsen, G. Skak-Braek, et O. Smidsrød, « Alginate as immobilization material : I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads », *Biotechnology and Bioengineering*, p. 79-89, 1989.
- [59] H. J. Kong, E. Wong, et D. J. Mooney, « Independent Control of Rigidity and Toughness of Polymeric Hydrogels », *Macromolecules*, vol. 36, n<sup>o</sup>. 12, p. 4582-4588, juin 2003.

## Bibliographie

---

- [60] C. Ouwerx, N. Velings, M. . Mestdag, et M. A. . Axelos, « Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations », *Polymer Gels and Networks*, vol. 6, n<sup>o</sup>. 5, p. 393-408, oct. 1998.
- [61] P. Degen, S. Leick, et H. Rehage, « Mechanical Stability of Ionotropic Alginate Beads », *Z. Phys. Chemie-Int. J. Res. Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 223, n<sup>o</sup>. 9, p. 1079-1090, 2009.
- [62] Ý. A. Mørch, I. Donati, et B. L. Strand, « Effect of Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> and Sr<sup>2+</sup> on Alginate Microbeads », *Biomacromolecules*, vol. 7, n<sup>o</sup>. 5, p. 1471-1480, mai 2006.
- [63] H. Zimmermann, M. Hillgärtner, B. Manz, P. Feilen, F. Brunnenmeier, U. Leinfelder, M. Weber, H. Cramer, S. Schneider, C. Hendrich, et others, « Fabrication of homogeneously cross-linked, functional alginate microcapsules validated by NMR-, CLSM-and AFM-imaging », *Biomaterials*, vol. 24, n<sup>o</sup>. 12, p. 2083–2096, 2003.
- [64] Y. A. Morch, I. Donati, B. L. Strand, et G. Skjak-Braek, « Effect of Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, and Sr<sup>2+</sup> on alginate microbeads », *Biomacromolecules*, vol. 7, n<sup>o</sup>. 5, p. 1471-1480, mai 2006.
- [65] B. Thu, O. Gåserød, D. Paus, A. Mikkelsen, G. Skjåk-Bræk, R. Toffanin, F. Vittur, et R. Rizzo, « Inhomogeneous alginate gel spheres: An assessment of the polymer gradients by synchrotron radiation-induced x-ray emission, magnetic resonance microimaging, and mathematical modeling », *Biopolymers*, vol. 53, n<sup>o</sup>. 1, p. 60–71, 2000.
- [66] B. L. Strand, Y. A. Mørch, T. Espevik, et G. Skjåk-Bræk, « Visualization of alginate–poly-L-lysine–alginate microcapsules by confocal laser scanning microscopy », *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 82, n<sup>o</sup>. 4, p. 386–394, 2003.
- [67] Y. A. Morch, *Novel alginate microcapsules for cell therapy*. Thèse, 2008.
- [68] V. Vaithilingam, G. Kollarikova, M. Qi, I. Lacik, J. Oberholzer, G. J. Guillemain, et B. E. Tuch, « Effect of prolonged gelling time on the intrinsic properties of barium alginate microcapsules and its biocompatibility », *Journal of microencapsulation*, vol. 28, n<sup>o</sup>. 6, p. 499–507, 2011.
- [69] J. L. Panza, W. R. Wagner, H. L. R. Role, R. H. Rao, E. J. Beckman, et A. J. Russell, « Treatment of rat pancreatic islets with reactive PEG », *Biomaterials*, vol. 21, n<sup>o</sup>. 11, p. 1155-1164, juin 2000.
- [70] L. S. Gazda, H. V. Vinerean, M. A. Laramore, C. H. Diehl, R. D. Hall, A. L. Rubin, et B. H. Smith, « Encapsulation of porcine islets permits extended culture time and insulin independence in spontaneously diabetic BB rats », *Cell Transplantation*, vol. 16, n<sup>o</sup>. 6, p. 609-620, 2007.
- [71] A. M. Hiscox, A. L. Stone, S. Limesand, J. B. Hoying, et S. K. Williams, « An islet-stabilizing implant constructed using a preformed vasculature », *Tissue Eng. Part A*, vol. 14, n<sup>o</sup>. 3, p. 433-440, mars 2008.
- [72] S. Boninsegna, P. Bosetti, G. Carturan, G. Dellagiacomma, R. Dal Monte, et M. Rossi, « Encapsulation of individual pancreatic islets by sol–gel SiO<sub>2</sub>: A novel procedure for perspective cellular grafts », *Journal of Biotechnology*, vol. 100, n<sup>o</sup>. 3, p. 277-286, févr. 2003.
- [73] L. Capretto, S. Mazzitelli, G. Luca, et C. Nastruzzi, « Preparation and characterization of polysaccharidic microbeads by a microfluidic technique: Application to the encapsulation of Sertoli cells », *Acta Biomaterialia*, vol. 6, n<sup>o</sup>. 2, p. 429–435, 2010.
- [74] C. Chang, B. Duan, et L. Zhang, « Fabrication and characterization of novel macroporous cellulose-alginate hydrogels », *Polymer*, vol. 50, n<sup>o</sup>. 23, p. 5467-5473, nov. 2009.

- [75] W. Yu, J. Lin, X. Liu, H. Xie, W. Zhao, et X. Ma, « Quantitative characterization of membrane formation process of alginate-chitosan microcapsules by GPC », *Journal of Membrane Science*, vol. 346, n° 2, p. 296–301, 2010.
- [76] D. Y. Lee, J. H. Nam, et Y. Byun, « Effect of polyethylene glycol grafted onto islet capsules on prevention of splenocyte and cytokine attacks », *J. Biomater. Sci.-Polym. Ed.*, vol. 15, n° 6, p. 753-766, 2004.
- [77] G. Vandenbossche, M. Bracke, C. Cuvelier, H. Bortier, M. Mareel, et J. Remon, « Host-Reaction Against Empty Alginate-Polylysine Microcapsules - Influence of Preparation Procedure », *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 45, n° 2, p. 115-120, févr. 1993.
- [78] P. de Vos, C. G. van Hoogmoed, B. J. de Haan, et H. J. Busscher, « Tissue responses against immunoisolating alginate-PLL capsules in the immediate posttransplant period », *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 62, n° 3, p. 430-437, déc. 2002.
- [79] S. Le Vot, « Microsystèmes pour l'encapsulation de cellules pancréatiques », UJF, 2009.
- [80] S. Schneider, P. J. Feilen, V. Slotty, D. Kampfner, S. Preuss, S. Berger, J. Beyer, et R. Pommersheim, « Multilayer capsules: a promising microencapsulation system for transplantation of pancreatic islets », *Biomaterials*, vol. 22, n° 14, p. 1961-1970, 2001.
- [81] M. De Castro, G. Orive, R. M. Hernandez, A. R. Gascon, et J. L. Pedraz, « Comparative study of microcapsules elaborated with three polycations (PLL, PDL, PLO) for cell immobilization », *J. Microencapsul.*, vol. 22, n° 3, p. 303-315, mai 2005.
- [82] M. D. Darrabie, W. F. Kendall, et E. C. Opara, « Characteristics of poly-L-ornithine-coated alginate microcapsules », *Biomaterials*, vol. 26, n° 34, p. 6846-6852, déc. 2005.
- [83] G. Orive, R. . Hernández, A. . Gascón, M. Igartua, et J. . Pedraz, « Development and optimisation of alginate-PMCG-alginate microcapsules for cell immobilisation », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 259, n° 1-2, p. 57-68, juin 2003.
- [84] F. Shen, A. a. H. Li, R. M. Cornelius, P. Cirone, R. F. Childs, J. L. Brash, et P. L. Chang, « Biological properties of photocrosslinked alginate microcapsules », *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, vol. 75B, n° 2, p. 425-434, nov. 2005.
- [85] I. Lacik, M. Briššová, A. V. Anilkumar, A. C. Powers, et Wang, T., « New capsule with tailored properties for the encapsulation of living cells », *Biomed Mater Res*, p. 52-60, 1998.
- [86] T. Wang, J. Adcock, W. Kühtreiber, D. Qiang, K. J. Salleng, I. Trenary, et P. Williams, « Successful allotransplantation of encapsulated islets in pancreatectomized canines for diabetic management without the use of immunosuppression », *Transplantation*, vol. 85, n° 3, p. 331-337, févr. 2008.
- [87] S. Ponce, G. Orive, R. Hernandez, A. R. Gascon, J. L. Pedraz, B. J. de Haan, M. M. Faas, H. J. Mathieu, et P. de Vos, « Chemistry and the biological response against immunoisolating alginate-polycation capsules of different composition », *Biomaterials*, vol. 27, n° 28, p. 4831-4839, oct. 2006.
- [88] R. Calafiore, G. Basta, G. Luca, A. Lemmi, M. Pia Montanucci, G. Calabrese, L. Racanicchi, F. Mancuso, et P. Brunetti, « Microencapsulated Pancreatic Islet Allografts Into Nonimmunosuppressed Patients With Type 1 Diabetes », *Emerging treatments and technologies*, janv-2006.
- [89] V. F. Duvivier-Kali, A. Omer, R. J. Parent, J. J. O'Neil, et G. C. Weir, « Complete Protection of Islets Against Allorejection and Autoimmunity by a Simple Barium-Alginate Membrane », *Diabetes*, vol. 50, n° 8, p. 1698-1705, janv. 2001.

## Bibliographie

---

- [90] T. Espevik, M. Otterlei, G. Skjåk-Braek, L. Ryan, S. D. Wright, et A. Sundan, « The involvement of CD14 in stimulation of cytokine production by uronic acid polymers », *Eur. J. Immunol.*, vol. 23, n<sup>o</sup>. 1, p. 255-261, janv. 1993.
- [91] H. A. Clayton, N. J. London, P. S. Colloby, P. R. Bell, et R. F. James, « The effect of capsule composition on the biocompatibility of alginate-poly-L-lysine capsules », *J Microencapsul*, vol. 8, n<sup>o</sup>. 2, p. 221-233, juin 1991.
- [92] P. De Vos, B. De Haan, et R. Van Schilfgaarde, « Effect of the alginate composition on the biocompatibility of alginate-polylysine microcapsules », *Biomaterials*, vol. 18, n<sup>o</sup>. 3, p. 273-278, févr. 1997.
- [93] A. King, S. Sandler, A. Andersson, C. Hellerstrom, B. Kulseng, et G. Skjak-Braek, « Glucose metabolism in vitro of cultured and transplanted mouse pancreatic islets microencapsulated by means of a high-voltage electrostatic field », *Diabetes Care*, vol. 22, p. B121-+, mars 1999.
- [94] B. L. Strand, L. Ryan, P. I. Veld, B. Kulseng, A. M. Rokstad, G. Skjak-Braek, et T. Espevik, « Poly-L-lysine induces fibrosis on alginate microcapsules via the induction of cytokines », *Cell Transplant.*, vol. 10, n<sup>o</sup>. 3, p. 263-275, 2001.
- [95] P. de Vos, B. J. de Haan, J. A. A. M. Kamps, M. M. Faas, et T. Kitano, « Zeta-potentials of alginate-PLL capsules: a predictive measure for biocompatibility? », *J Biomed Mater Res A*, vol. 80, n<sup>o</sup>. 4, p. 813-819, mars 2007.
- [96] P. de Vos, C. G. van Hoogmoed, J. van Zanten, S. Netter, J. H. Strubbe, et H. J. Busscher, « Long-term biocompatibility, chemistry, and function of microencapsulated pancreatic islets », *Biomaterials*, vol. 24, n<sup>o</sup>. 2, p. 305-312, janv. 2003.
- [97] S. K. Tam, J. Dusseault, S. Polizu, M. Ménard, J.-P. Hallé, et L. Yahia, « Physicochemical model of alginate-poly-L-lysine microcapsules defined at the micrometric/nanometric scale using ATR-FTIR, XPS, and ToF-SIMS », *Biomaterials*, vol. 26, n<sup>o</sup>. 34, p. 6950-6961, déc. 2005.
- [98] G. Orive, S. Ponce, R. M. Hernández, A. R. Gascón, M. Igartua, et J. L. Pedraz, « Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates », *Biomaterials*, vol. 23, n<sup>o</sup>. 18, p. 3825-3831, sept. 2002.
- [99] M. Ménard, J. Dusseault, G. Langlois, W. E. Baille, S. K. Tam, L. Yahia, X. X. Zhu, et J.-P. Hallé, « Role of protein contaminants in the immunogenicity of alginates », *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, vol. 93, n<sup>o</sup>. 2, p. 333-340, mai 2010.
- [100] D. S. Vidal-Serp et C. Wandrey, « Purification of natural anionic polymers », *Minerva Biotechnol.*, vol. 17, n<sup>o</sup>. 4, p. 215-229, déc. 2005.
- [101] P. De Vos, B. J. De Haan, G. H. Wolters, J. H. Strubbe, et R. Van Schilfgaarde, « Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for microencapsulation of pancreatic islets », *Diabetologia*, vol. 40, n<sup>o</sup>. 3, p. 262-270, mars 1997.
- [102] G. Langlois, J. Dusseault, S. Bilodeau, S. K. Tam, D. Magassouba, et J.-P. Hallé, « Direct effect of alginate purification on the survival of islets immobilized in alginate-based microcapsules », *Acta Biomaterialia*, vol. 5, n<sup>o</sup>. 9, p. 3433-3440, nov. 2009.
- [103] H. Zhang, E. Tumarkin, R. Peerani, Z. Nie, R. M. A. Sullan, G. C. Walker, et E. Kumacheva, « Microfluidic Production of Biopolymer Microcapsules with Controlled Morphology », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 128, n<sup>o</sup>. 37, p. 12205-12210, sept. 2006.

- [104] C. G. Thanos, B. E. Bintz, et D. F. Emerich, « Stability of alginate-polyornithine microcapsules is profoundly dependent on the site of transplantation », *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 81A, n°. 1, p. 1-11, avr. 2007.
- [105] G.-A. Junter et F. Vinet, « Compressive properties of yeast cell-loaded Ca-alginate hydrogel layers: Comparison with alginate–CaCO<sub>3</sub> microparticle composite gel structures », *Chemical Engineering Journal*, vol. 145, n°. 3, p. 514-521, janv. 2009.
- [106] V. B. Nguyen, C. X. Wang, C. R. Thomas, et Z. Zhang, « Mechanical properties of single alginate microspheres determined by microcompression and finite element modelling », *Chemical Engineering Science*, vol. 64, n°. 5, p. 821-829, mars 2009.
- [107] M. W. Keller et N. R. Sottos, « Mechanical Properties of Microcapsules Used in a Self-Healing Polymer », *Experimental Mechanics*, vol. 46, n°. 6, p. 725-733, nov. 2006.
- [108] K.-K. Liu, « Deformation behaviour of soft particles: a review », *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 39, n°. 11, p. R189-R199, juin 2006.
- [109] « Elastic and viscoelastic characterization of microcapsules for drug delivery using a force-feedback MEMS microgripper », *Biomed. Microdevices (Netherlands)*, vol. 11, n°. 2, p. 421-427427, avr. 2009.
- [110] M. Lekka, D. Sainz-Serp, A. J. Kulik, et C. Wandrey, « Hydrogel Microspheres: Influence of Chemical Composition on Surface Morphology, Local Elastic Properties, and Bulk Mechanical Characteristics », *Langmuir*, vol. 20, n°. 23, p. 9968-9977, nov. 2004.
- [111] M. Moresi, M. Bruno, et E. Parente, « Viscoelastic properties of microbial alginate gels by oscillatory dynamic tests », *Journal of Food Engineering*, vol. 64, n°. 2, p. 179-186, sept. 2004.
- [112] R. Calafiore, G. Basta, G. Luca, C. Boselli, A. Bufalari, G. M. Giustozzi, L. Moggi, et P. Brunetti, « Alginate/polyaminoacidic coherent microcapsules for pancreatic islet graft immunoisolation in diabetic recipients », in *Bioartificial Organs: Science, Medicine, and Technology*, vol. 831, A. Prokop, D. Hunkeler, et A. D. Cherrington, Éd. New York: New York Acad Sciences, 1997, p. 313-322.
- [113] B. Kulseng, B. Thu, T. Espevik, et G. Skjåk-Bræk, « Alginate polylysine microcapsules as immune barrier: Permeability of cytokines and immunoglobulins over the capsule membrane », *Cell Transplantation*, vol. 6, n°. 4, p. 387-394, juill. 1997.
- [114] M. Briššová, M. Petro, I. Lacić, A. C. Powers, et T. Wang, « Evaluation of Microcapsule Permeability via Inverse Size Exclusion Chromatography », *Analytical Biochemistry*, vol. 242, n°. 1, p. 104-111, nov. 1996.
- [115] S. Ye, C. Wang, X. Liu, Z. Tong, B. Ren, et F. Zeng, « New loading process and release properties of insulin from polysaccharide microcapsules fabricated through layer-by-layer assembly », *Journal of Controlled Release*, vol. 112, n°. 1, p. 79-87, mai 2006.
- [116] K. E. Crompton, R. J. Prankerd, D. M. Paganin, T. F. Scott, M. K. Horne, D. I. Finkelstein, K. A. Gross, et J. S. Forsythe, « Morphology and gelation of thermosensitive chitosan hydrogels », *Biophysical Chemistry*, vol. 117, n°. 1, p. 47-53, août 2005.
- [117] M. Robitzer, L. David, C. Rochas, F. Di Renzo, et F. Quignard, « Supercritically-Dried Alginate Aerogels Retain the Fibrillar Structure of the Hydrogels », in *Macromolecular Symposia*, 2008, vol. 273, p. 80–84.
- [118] M. Robitzer, L. David, C. Rochas, F. D. Renzo, et F. Quignard, « Nanostructure of Calcium Alginate Aerogels Obtained from Multistep Solvent Exchange Route », *Langmuir*, vol. 24, n°. 21, p. 12547-12552, nov. 2008.



## Bibliographie

---

- [119] L. W. Chan, H. Y. Lee, et P. W. S. Heng, « Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system », *Carbohydrate Polymers*, vol. 63, n<sup>o</sup>. 2, p. 176-187, févr. 2006.
- [120] P. de Vos, C. G. Hoogmoed, et H. J. Busscher, « Chemistry and biocompatibility of alginate-PLL capsules for immunoprotection of mammalian cells », *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 60, n<sup>o</sup>. 2, p. 252-259, mai 2002.
- [121] P. Soon-Shiong, E. Feldman, R. Nelson, R. Heintz, Q. Yao, Z. Yao, T. Zheng, N. Merideth, G. Skjak-Braek, et T. Espevik, « Long-term reversal of diabetes by the injection of immunoprotected islets. », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 90, n<sup>o</sup>. 12, p. 5843-5847, juin 1993.
- [122] Y. Sun, X. Ma, D. Zhou, I. Vacek, et A. M. Sun, « Normalization of diabetes in spontaneously diabetic cynomolgus monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppression », *J. Clin. Invest.*, vol. 98, n<sup>o</sup>. 6, p. 1417-1422, sept. 1996.
- [123] R. B. Elliott, L. Escobar, P. L. J. Tan, O. Garkavenko, R. Calafiore, P. Basta, A. V. Vasconcellos, D. F. Emerich, C. Thanos, et C. Bambra, « Intraperitoneal Alginate-Encapsulated Neonatal Porcine Islets in a Placebo-Controlled Study With 16 Diabetic Cynomolgus Primates », *Transplantation Proceedings*, vol. 37, n<sup>o</sup>. 8, p. 3505-3508, oct. 2005.
- [124] B. E. Tuch, G. W. Keogh, L. J. Williams, W. Wu, J. L. Foster, V. Vaithilingam, et R. Philips, « Safety and viability of microencapsulated human islets transplanted into diabetic humans », *Diabetes Care*, vol. 32, n<sup>o</sup>. 10, p. 1887-1889, oct. 2009.
- [125] V. Vaithilingam, J. Oberholzer, G. J. Guillemin, et B. E. Tuch, « The humanized NOD/SCID mouse as a preclinical model to study the fate of encapsulated human islets », *Rev Diabet Stud*, vol. 7, n<sup>o</sup>. 1, p. 62-73, 2010.
- [126] U. Prüsse, L. Bilancetti, M. Bučko, B. Bugarski, J. Bukowski, P. Gemeiner, D. Lewińska, V. Manojlovic, B. Massart, C. Nastruzzi, V. Nedovic, D. Poncelet, S. Siebenhaar, L. Tobler, A. Tosi, A. Vikartovská, et K.-D. Vorlop, « Comparison of different technologies for alginate beads production », *Chemical Papers*, vol. 62, n<sup>o</sup>. 4, p. 364-374, 2008.
- [127] P. De Vos, B. J. DeHaan, et R. VanSchilfgaarde, « Upscaling the production of microencapsulated pancreatic islets », *Biomaterials*, vol. 18, n<sup>o</sup>. 16, p. 1085-1090, août 1997.
- [128] G. H. Wolters, W. M. Fritschy, D. Gerrits, et R. van Schilfgaarde, « A versatile alginate droplet generator applicable for microencapsulation of pancreatic islets », *J Appl Biomater*, vol. 3, n<sup>o</sup>. 4, p. 281-286, 1991.
- [129] B. L. Strand, O. Gåserød, B. Kulseng, T. Espevik, et G. Skjåk-Bræk, « Alginate-polylysine-alginate microcapsules: effect of size reduction on capsule properties », *Journal of Microencapsulation*, vol. 19, n<sup>o</sup>. 5, p. 615-630, janv. 2002.
- [130] M. F. A. Goosen, A. S. AlGhafri, O. ElMardi, M. I. J. AlBelushi, H. A. AlHajri, E. S. E. Mahmoud, et E. C. Consolacion, « Electrostatic droplet generation for encapsulation of somatic tissue: Assessment of high-voltage power supply », *Biotechnol. Prog.*, vol. 13, n<sup>o</sup>. 4, p. 497-502, août 1997.
- [131] D. B. Seifert et J. A. Phillips, « Production of small, monodispersed alginate beads for cell immobilization », *Biotechnol. Prog.*, vol. 13, n<sup>o</sup>. 5, p. 562-568, oct. 1997.

## Bibliographie

---

- [132] U. Prusse, J. Dalluhn, J. Breford, et K. D. Vorlop, « Production of spherical beads by JetCutting », *Chem. Eng. Technol.*, vol. 23, n°. 12, p. 1105-1110, déc. 2000.
- [133] H. Zimmermann, F. Ehrhart, D. Zimmermann, K. Mueller, A. Katsen-Globa, M. Behringer, P. J. Feilen, P. Gessner, G. Zimmermann, S. G. Shirley, M. M. Weber, J. Metze, et U. Zimmermann, « Hydrogel-based encapsulation of biological, functional tissue: fundamentals, technologies and applications », *Appl. Phys. A-Mater. Sci. Process.*, vol. 89, n°. 4, p. 909-922, déc. 2007.
- [134] « <http://www.nisco.ch/units.htm> ».
- [135] « <http://www.buchi.com/Spray-Drying.69.0.html> ».
- [136] L.-S. Kontturi, M. Yliperttula, P. Toivanen, A. Määttä, A.-M. Määttä, et A. Urtti, « A laboratory-scale device for the straightforward production of uniform, small sized cell microcapsules with long-term cell viability », *J Control Release*, vol. 152, n°. 3, p. 376-381, juin 2011.
- [137] E.-S. Chan, B.-B. Lee, P. Ravindra, et D. Poncelet, « Prediction models for shape and size of calcium alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method », *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 338, n°. 1, p. 63-72, oct. 2009.
- [138] S. Wiedemeier, F. Ehrhart, E. Mettler, G. Gastrock, T. Forst, M. M. Weber, H. Zimmermann, et J. Metze, « Encapsulation of Langerhans' islets: Microtechnological developments for transplantation », *Engineering in Life Sciences*, vol. 11, n°. 2, p. 165-173, avr. 2011.
- [139] G. D. Martin, S. D. Hoath, et I. M. Hutchings, « Inkjet printing - the physics of manipulating liquid jets and drops », in *Engineering and Physics - Synergy for Success*, vol. 105, Bristol: Iop Publishing Ltd, 2008.
- [140] J. Brünahl et A. M. Grishin, « Piezoelectric shear mode drop-on-demand inkjet actuator », *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 101, n°. 3, p. 371-382, oct. 2002.
- [141] J. Dohnal et F. Štěpánek, « Inkjet fabrication and characterization of calcium alginate microcapsules », *Powder Technology*, vol. 200, n°. 3, p. 254-259, juin 2010.
- [142] Y. Lin et Y. Huang, « Laser-assisted fabrication of highly viscous alginate microsphere », *J. Appl. Phys.*, vol. 109, n°. 8, avr. 2011.
- [143] S. Tendulkar, S.-H. Mirmalek-Sani, C. Childers, J. Saul, E. C. Opara, et M. K. Ramasubramanian, « A three-dimensional microfluidic approach to scaling up microencapsulation of cells », *Biomedical Microdevices*, vol. 14, n°. 3, p. 461-469, 2012.
- [144] A. V. Anilkumar, I. Lacik, et T. . Wang, « A novel reactor for making uniform capsules », *Biotechnology and Bioengineering*, p. 581-589, 2001.
- [145] D. Lewińska, A. Chwojnowski, C. Wojciechowski, B. Kupikowska-Stobba, M. Grzeczko, et A. Weryński, « Electrostatic Droplet Generator with 3-Coaxial-Nozzle Head for Microencapsulation of Living Cells in Hydrogel Covered by Synthetic Polymer Membranes », *Separation Science and Technology*, vol. 47, n°. 3, p. 463-469, 2012.
- [146] P. Tabeling, *Introduction to Microfluidics*. Oxford University Press, 2006.
- [147] T. Vilkner, D. Janasek, et A. Manz, « Micro total analysis systems. Recent developments », *Anal. Chem.*, vol. 76, n°. 12, p. 3373-3385, juin 2004.



## Bibliographie

---

- [148] S. Haeberle et R. Zengerle, « Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications », *Lab on a Chip*, vol. 7, n° 9, p. 1094, 2007.
- [149] Y.-K. Cho, J.-G. Lee, J.-M. Park, B.-S. Lee, Y. Lee, et C. Ko, « One-step pathogen specific DNA extraction from whole blood on a centrifugal microfluidic device », *Lab on a Chip*, vol. 7, n° 5, p. 565, 2007.
- [150] A. Hatch, A. E. Kamholz, K. R. Hawkins, M. S. Munson, E. A. Schilling, B. H. Weigl, et P. Yager, « A rapid diffusion immunoassay in a T-sensor », *Nat. Biotechnol.*, vol. 19, n° 5, p. 461-465, mai 2001.
- [151] B. El Debs, R. Utharala, I. V. Balyasnikova, A. D. Griffiths, et C. A. Merten, « Functional single-cell hybridoma screening using droplet-based microfluidics », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, n° 29, p. 11570–11575, 2012.
- [152] H. Andersson et A. van den Berg, « Microfluidic devices for cellomics: a review », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 92, n° 3, p. 315-325, juill. 2003.
- [153] P. Rupprecht, L. Golé, J.-P. Rieu, C. Vézy, R. Ferrigno, H. C. Mertani, et C. Rivière, « A tapered channel microfluidic device for comprehensive cell adhesion analysis, using measurements of detachment kinetics and shear stress-dependent motion », *Biomicrofluidics*, vol. 6, n° 1, p. 014107-014107-12, janv. 2012.
- [154] S. Neethirajan, I. Kobayashi, M. Nakajima, D. Wu, S. Nandagopal, et F. Lin, « Microfluidics for food, agriculture and biosystems industries », *Lab on a Chip*, vol. 11, n° 9, p. 1574, 2011.
- [155] « <http://www.liquid-logic.com/> ».
- [156] « <http://raindancetech.com/> ».
- [157] G. Muschiolik, « Multiple emulsions for food use », *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 12, n° 4-5, p. 213-220, oct. 2007.
- [158] B. Kintsjes, L. D. van Vliet, S. R. Devenish, et F. Hollfelder, « Microfluidic droplets: new integrated workflows for biological experiments », *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 14, n° 5, p. 548-555, oct. 2010.
- [159] S. Sant, S. L. Tao, O. Z. Fisher, Q. Xu, N. A. Peppas, et A. Khademhosseini, « Microfabrication technologies for oral drug delivery », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, n° 6, p. 496-507, mai 2012.
- [160] H. Yin et D. Marshall, « Microfluidics for single cell analysis », *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 23, n° 1, p. 110-119, févr. 2012.
- [161] E. Brouzes, M. Medkova, N. Savenelli, D. Marran, M. Twardowski, J. B. Hutchison, J. M. Rothberg, D. R. Link, N. Perrimon, et M. L. Samuels, « Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, n° 34, p. 14195-14200, août 2009.
- [162] W. Wang, X. Liu, Y. Xie, H. Zhang, W. Yu, Y. Xiong, W. Xie, et X. Ma, « Microencapsulation using natural polysaccharides for drug delivery and cell implantation », *Journal of Materials Chemistry*, vol. 16, n° 32, p. 3252, 2006.
- [163] K. Ishihara, Y. Xu, et T. Konno, « Cytocompatible Hydrogel Composed of Phospholipid Polymers for Regulation of Cell Functions », in *Polymers in Nanomedicine*, vol. 247, S. Kunugi et T. Yamaoka, Éd. Berlin: Springer-Verlag Berlin, 2012, p. 141-165.

## Bibliographie

---

- [164] H. Karbstein et H. Schubert, « Developments in the continuous mechanical production of oil-in-water macro-emulsions », *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, vol. 34, n<sup>o</sup>. 3, p. 205-211, juin 1995.
- [165] « La microfluidique ou l'art de manipuler des petits volumes de liquides ». Clé CEA n52, 2005.
- [166] L. Malic, T. Veres, et M. Tabrizian, « Biochip functionalization using electrowetting-on-dielectric digital microfluidics for surface plasmon resonance imaging detection of DNA hybridization », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, n<sup>o</sup>. 7, p. 2218-2224, mars 2009.
- [167] D. Jary, A. Chollat-Namy, Y. Fouillet, J. Boutet, C. Chabrol, G. Castellan, D. Gasparutto, et C. Peponnet, « DNA repair enzyme analysis on EWOD fluidic microprocessor », in *2006 NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show - NSTI Nanotech 2006 Technical Proceedings*, 2006, vol. 2, p. 554-557.
- [168] M. J. Jebrail et A. R. Wheeler, « Let's get digital: digitizing chemical biology with microfluidics », *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 14, n<sup>o</sup>. 5, p. 574-581, oct. 2010.
- [169] G. T. Vladislavjevic, I. Kobayashi, et M. Nakajima, « Production of uniform droplets using membrane, microchannel and microfluidic emulsification devices », *Microfluid. Nanofluid.*, vol. 13, n<sup>o</sup>. 1, p. 151-178, juill. 2012.
- [170] Y. H. Choi, Y. S. Song, et D. H. Kim, « Droplet-based microextraction in the aqueous two-phase system », *Journal of Chromatography A*, vol. 1217, n<sup>o</sup>. 24, p. 3723-3728, juin 2010.
- [171] W. Engl, R. Backov, et P. Panizza, « Controlled production of emulsions and particles by milli- and microfluidic techniques », *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 13, n<sup>o</sup>. 4, p. 206-216, août 2008.
- [172] G. F. Christopher et S. L. Anna, « Microfluidic methods for generating continuous droplet streams », *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 40, n<sup>o</sup>. 19, p. R319-R336, oct. 2007.
- [173] T. Nakashima, M. Shimizu, et M. Kukizaki, *Membrane Emulsification by Microporous Glass*. Zurich: Trans Tech Publications Ltd, 1991.
- [174] U. Lambrich et H. Schubert, « Emulsification using microporous systems », *Journal of Membrane Science*, vol. 257, n<sup>o</sup>. 1-2, p. 76-84, juill. 2005.
- [175] T. Nakashima, M. Shimizu, et M. Kukizaki, « Particle control of emulsion by membrane emulsification and its applications », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 45, n<sup>o</sup>. 1, p. 47-56, déc. 2000.
- [176] T. Thorsen, R. W. Roberts, F. H. Arnold, et S. R. Quake, « Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 86, n<sup>o</sup>. 18, p. 4163-4166, avr. 2001.
- [177] J. H. Xu, S. W. Li, J. Tan, et G. S. Luo, « Correlations of droplet formation in T-junction microfluidic devices: from squeezing to dripping », *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 5, n<sup>o</sup>. 6, p. 711-717, mai 2008.
- [178] X.-B. Li, F.-C. Li, J.-C. Yang, H. Kinoshita, M. Oishi, et M. Oshima, « Study on the mechanism of droplet formation in T-junction microchannel », *Chemical Engineering Science*, vol. 69, n<sup>o</sup>. 1, p. 340-351, févr. 2012.
- [179] S. L. Anna, N. Bontoux, et H. A. Stone, « Formation of dispersions using "flow focusing" in microchannels », *Applied Physics Letters*, vol. 82, n<sup>o</sup>. 3, p. 364, 2003.
- [180] Y. C. Tan, V. Cristini, et A. P. Lee, « Monodispersed microfluidic droplet generation by shear focusing microfluidic device », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 114, n<sup>o</sup>. 1, p. 350-356, 2006.

## Bibliographie

---

- [181] W. Lee, L. M. Walker, et S. L. Anna, « Role of geometry and fluid properties in droplet and thread formation processes in planar flow focusing », *Physics of Fluids*, vol. 21, n°. 3, p. 032103, 2009.
- [182] C. Zhou, P. Yue, et J. J. Feng, « Formation of simple and compound drops in microfluidic devices », *Phys. Fluids*, vol. 18, n°. 9, sept. 2006.
- [183] P. Garstecki, H. A. Stone, et G. M. Whitesides, « Mechanism for flow-rate controlled breakup in confined geometries: A route to monodisperse emulsions », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 94, n°. 16, avr. 2005.
- [184] Q. Y. Xu et M. Nakajima, « The generation of highly monodisperse droplets through the breakup of hydrodynamically focused microthread in a microfluidic device », *Appl. Phys. Lett.*, vol. 85, n°. 17, p. 3726-3728, oct. 2004.
- [185] J. Berthier, S. Le Vot, P. Tiquet, N. David, D. Lauro, P. Y. Benhamou, et F. Rivera, « Highly viscous fluids in pressure actuated flow focusing devices », *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 158, n°. 1, p. 140-148, mars 2010.
- [186] A. R. Abate, A. Poitzsch, Y. Hwang, J. Lee, J. Czerwinska, et D. A. Weitz, « Impact of inlet channel geometry on microfluidic drop formation », *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, vol. 80, août 2009.
- [187] A. R. Abate, M. B. Romanowsky, J. J. Agresti, et D. A. Weitz, « Valve-based flow focusing for drop formation », *Appl. Phys. Lett.*, vol. 94, n°. 2, janv. 2009.
- [188] H.-W. Wu, Y.-C. Huang, C.-L. Wu, et G.-B. Lee, « Exploitation of a microfluidic device capable of generating size-tunable droplets for gene delivery », *Microfluid. Nanofluid.*, vol. 7, n°. 1, p. 45-56, juill. 2009.
- [189] W. Li, Z. Nie, H. Zhang, C. Paquet, M. Seo, P. Garstecki, et E. Kumacheva, « Screening of the Effect of Surface Energy of Microchannels on Microfluidic Emulsification », *Langmuir*, vol. 23, n°. 15, p. 8010-8014, juill. 2007.
- [190] Dreyfus, R, T. P, et W. H, « Ordered and disordered patterns in two-phase flows in microchannels », *Phys. Rev. Lett. (USA)*, vol. 90, n°. 14, p. 144505/1, avr. 2003.
- [191] M. Wanebo, B. Kobrin, F. Helmrich, et J. Chinn, « Molecular vapor deposition (MVD trade;) - a new method of applying moisture barriers for packaging applications », in *Advanced Packaging Materials: Processes, Properties and Interfaces, 2005. Proceedings. International Symposium on*, 2005, p. 136 - 138.
- [192] A. S. Utada, A. Fernandez-Nieves, J. M. Gordillo, et D. A. Weitz, « Absolute Instability of a Liquid Jet in a Coflowing Stream », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 100, n°. 1, p. 014502, janv. 2008.
- [193] P. B. Umbanhowar, V. Prasad, et D. A. Weitz, « Monodisperse emulsion generation via drop break off in a coflowing stream », *Langmuir*, vol. 16, n°. 2, p. 347-351, janv. 2000.
- [194] R. K. Shah, H. C. Shum, A. C. Rowat, D. Lee, J. J. Agresti, A. S. Utada, L.-Y. Chu, J.-W. Kim, A. Fernandez-Nieves, C. J. Martinez, et D. A. Weitz, « Designer emulsions using microfluidics », *Materials Today*, vol. 11, n°. 4, p. 18-27, avr. 2008.
- [195] A. S. Utada, E. Lorenceau, D. R. Link, P. D. Kaplan, H. A. Stone, et D. A. Weitz, « Monodisperse Double Emulsions Generated from a Microcapillary Device », *Science*, vol. 308, n°. 5721, p. 537-541, avr. 2005.
- [196] A. Silva-Cunha, M. Chéron, J. . Grossiord, F. Puisieux, et M. Seiller, « W/O/W multiple emulsions of insulin containing a protease inhibitor and an absorption enhancer: biological activity after oral

administration to normal and diabetic rats », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 169, n° 1, p. 33-44, juin 1998.

[197] A. Edris et B. Bergnsthål, « Encapsulation of orange oil in a spray dried double emulsion », *Food / Nahrung*, vol. 45, n° 2, p. 133-137, 2001.

[198] H. C. Shum, D. Lee, I. Yoon, T. Kodger, et D. A. Weitz, « Double Emulsion Templated Monodisperse Phospholipid Vesicles », *Langmuir*, vol. 24, n° 15, p. 7651-7653, août 2008.

[199] A. R. Abate et D. A. Weitz, « High-Order Multiple Emulsions Formed in Poly(dimethylsiloxane) Microfluidics », *Small*, vol. 5, n° 18, p. 2030-2032, 2009.

[200] S. Okushima, T. Nisisako, T. Torii, et T. Higuchi, « Controlled Production of Monodisperse Double Emulsions by Two-Step Droplet Breakup in Microfluidic Devices », *Langmuir*, vol. 20, n° 23, p. 9905-9908, 2004.

[201] W. Wang, R. Xie, X.-J. Ju, T. Luo, L. Liu, D. A. Weitz, et L.-Y. Chu, « Controllable microfluidic production of multicomponent multiple emulsions », *Lab Chip*, vol. 11, n° 9, p. 1587-1592, 2011.

[202] A. R. Abate, J. Thiele, et D. A. Weitz, « One-step formation of multiple emulsions in microfluidics », *Lab on a Chip*, vol. 11, n° 2, p. 253, 2011.

[203] E. Kumacheva et P. Garstecki, *Microfluidic Reactors for Polymer Particles*. John Wiley & Sons, 2011.

[204] W. J. Duncanson, T. Lin, A. R. Abate, S. Seiffert, R. K. Shah, et D. A. Weitz, « Microfluidic synthesis of advanced microparticles for encapsulation and controlled release », *Lab on a Chip*, vol. 12, n° 12, p. 2135, 2012.

[205] P. Erni, C. Cramer, I. Marti, E. J. Windhab, et P. Fischer, « Continuous flow structuring of anisotropic biopolymer particles », *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 150, n° 1, p. 16-26, août 2009.

[206] R. F. Shepherd, J. C. Conrad, S. K. Rhodes, D. R. Link, M. Marquez, D. A. Weitz, et J. A. Lewis, « Microfluidic Assembly of Homogeneous and Janus Colloid-Filled Hydrogel Granules », *Langmuir*, vol. 22, n° 21, p. 8618-8622, oct. 2006.

[207] S. Seiffert et D. A. Weitz, « Microfluidic fabrication of smart microgels from macromolecular precursors », *Polymer*, vol. 51, n° 25, p. 5883-5889, nov. 2010.

[208] A. Kumachev, J. Greener, E. Tumarkin, E. Eiser, P. W. Zandstra, et E. Kumacheva, « High-throughput generation of hydrogel microbeads with varying elasticity for cell encapsulation », *Biomaterials*, vol. 32, n° 6, p. 1477-1483, févr. 2011.

[209] S. Xu, Z. Nie, M. Seo, P. Lewis, E. Kumacheva, H. A. Stone, P. Garstecki, D. B. Weibel, I. Gitlin, et G. M. Whitesides, « Generation of Monodisperse Particles by Using Microfluidics: Control over Size, Shape, and Composition », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 44, n° 5, p. 724-728, janv. 2005.

[210] V. A. Liu et S. N. Bhatia, « Three-dimensional photopatterning of hydrogels containing living cells », *Biomed. Microdevices*, vol. 4, n° 4, p. 257-266, déc. 2002.

[211] J. Yeh, Y. Ling, J. M. Karp, J. Gantz, A. Chandawarkar, G. Eng, J. Blumling, R. Langer, et A. Khademhosseini, « Micromolding of shape-controlled, harvestable cell-laden hydrogels », *Biomaterials*, vol. 27, n° 31, p. 5391-5398, nov. 2006.

## Bibliographie

---

- [212] E. Tumarkin et E. Kumacheva, « Microfluidic generation of microgels from synthetic and natural polymers », *Chemical Society Reviews*, vol. 38, n° 8, p. 2161, 2009.
- [213] D. Poncelet, R. Lencki, C. Beaulieu, J. P. Halle, R. J. Neufeld, et A. Fournier, « Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 38, n° 1, p. 39-45, oct. 1992.
- [214] K.-S. Huang, T.-H. Lai, et Y.-C. Lin, « Manipulating the generation of Ca-alginate microspheres using microfluidic channels as a carrier of gold nanoparticles », *Lab on a Chip*, vol. 6, n° 7, p. 954, 2006.
- [215] L. Capretto, S. Mazzitelli, C. Balestra, A. Tosi, et C. Nastruzzi, « Effect of the gelation process on the production of alginate microbeads by microfluidic chip technology », *Lab on a Chip*, vol. 8, n° 4, p. 617, 2008.
- [216] S.-B. Huang, M.-H. Wu, et G.-B. Lee, « Microfluidic device utilizing pneumatic micro-vibrators to generate alginate microbeads for microencapsulation of cells », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 147, n° 2, p. 755-764, juin 2010.
- [217] M.-H. Wu et W.-C. Pan, « Development of microfluidic alginate microbead generator tunable by pulsed airflow injection for the microencapsulation of cells », *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 8, n° 6, p. 823-835, oct. 2009.
- [218] S. Sugiura, T. Oda, Y. Izumida, Y. Aoyagi, M. Satake, A. Ochiai, N. Ohkohchi, et M. Nakajima, « Size control of calcium alginate beads containing living cells using micro-nozzle array », *Biomaterials*, vol. 26, n° 16, p. 3327-3331, juin 2005.
- [219] K. Liu, H. J. Ding, J. Liu, Y. Chen, et X. Z. Zhao, « Shape-controlled production of biodegradable calcium alginate gel microparticles using a novel microfluidic device », *Langmuir*, vol. 22, n° 22, p. 9453-9457, 2006.
- [220] H. Chen, Y. Zhao, J. Li, M. Guo, J. Wan, D. A. Weitz, et H. A. Stone, « Reactions in double emulsions by flow-controlled coalescence of encapsulated drops », *Lab on a Chip*, vol. 11, n° 14, p. 2312, 2011.
- [221] E. Um, D.-S. Lee, H.-B. Pyo, et J.-K. Park, « Continuous generation of hydrogel beads and encapsulation of biological materials using a microfluidic droplet-merging channel », *Microfluid. Nanofluid.*, vol. 5, n° 4, p. 541-549, oct. 2008.
- [222] M. Kalyanaraman, S. T. Retterer, T. E. McKnight, M. N. Ericson, S. L. Allman, J. G. Elkins, A. V. Palumbo, M. Keller, et M. J. Doktycz, « Controlled microfluidic production of alginate beads for in situ encapsulation of microbes », in *Biomedical Science Engineering Conference, 2009. BSEC 2009. First Annual ORNL*, 2009, p. 1-4.
- [223] H. Zhang, E. Tumarkin, R. M. A. Sullan, G. C. Walker, et E. Kumacheva, « Exploring microfluidic routes to microgels of biological polymers », *Macromolecular rapid communications*, vol. 28, n° 5, p. 527-538, 2007.
- [224] C. Kim, K. S. Lee, Y. E. Kim, K.-J. Lee, S. H. Lee, T. S. Kim, et J. Y. Kang, « Rapid exchange of oil-phase in microencapsulation chip to enhance cell viability », *Lab on a Chip*, vol. 9, n° 9, p. 1294, 2009.
- [225] C. Kim, S. Chung, Y. E. Kim, K. S. Lee, S. H. Lee, K. W. Oh, et J. Y. Kang, « Generation of core-shell microcapsules with three-dimensional focusing device for efficient formation of cell spheroid », *Lab on a Chip*, vol. 11, n° 2, p. 246, 2011.
- [226] V. L. Workman, S. B. Dunnett, P. Kille, et D. D. Palmer, « On-Chip Alginate Microencapsulation of Functional Cells », *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 29, n° 2, p. 165-170, 2008.

## Bibliographie

---

- [227] E. Kang, S.-J. Shin, K. H. Lee, et S.-H. Lee, « Novel PDMS cylindrical channels that generate coaxial flow, and application to fabrication of microfibers and particles », *Lab on a Chip*, vol. 10, n°. 14, p. 1856, 2010.
- [228] C. M. Silva, A. J. Ribeiro, M. Figueiredo, D. Ferreira, et F. Veiga, « Microencapsulation of hemoglobin in chitosan-coated alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation », *AAPS J*, vol. 7, n°. 4, p. E903-913, 2005.
- [229] W.-H. Tan et S. Takeuchi, « Monodisperse Alginate Hydrogel Microbeads for Cell Encapsulation », *Advanced Materials*, vol. 19, n°. 18, p. 2696-2701, sept. 2007.
- [230] C. A. Hoesli, K. Raghuram, R. L. J. Kiang, D. Mocinecová, X. Hu, J. D. Johnson, I. Lacík, T. J. Kieffer, et J. M. Piret, « Pancreatic cell immobilization in alginate beads produced by emulsion and internal gelation », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 108, n°. 2, p. 424-434, févr. 2011.
- [231] Y. Hu, Q. Wang, J. Wang, J. Zhu, H. Wang, et Y. Yang, « Shape controllable microgel particles prepared by microfluidic combining external ionic crosslinking », *Biomicrofluidics*, vol. 6, n°. 2, p. 026502, 2012.
- [232] E. H. Wong, E. Rondeau, P. Schuetz, et J. Cooper-White, « A microfluidic-based method for the transfer of biopolymer particles from an oil phase to an aqueous phase », *Lab on a Chip*, vol. 9, n°. 17, p. 2582, 2009.
- [233] Y. Deng, N. Zhang, L. Zhao, X. Yu, X. Ji, W. Liu, S. Guo, K. Liu, et X.-Z. Zhao, « Rapid purification of cell encapsulated hydrogel beads from oil phase to aqueous phase in a microfluidic device », *Lab on a Chip*, vol. 11, n°. 23, p. 4117, 2011.
- [234] Matosevic, S et Paegel, B., « Stepwise Synthesis of Giant Unilamellar Vesicles on a Microfluidic Assembly Line », 2011.
- [235] C. J. Martinez, J. W. Kim, C. Ye, I. Ortiz, A. C. Rowat, M. Marquez, et D. Weitz, « A Microfluidic Approach to Encapsulate Living Cells in Uniform Alginate Hydrogel Microparticles », *Macromolecular Bioscience*, vol. 12, n°. 7, p. 946–951, 2012.
- [236] P.-W. Ren, X.-J. Ju, R. Xie, et L.-Y. Chu, « Monodisperse alginate microcapsules with oil core generated from a microfluidic device », *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 343, n°. 1, p. 392-395, mars 2010.
- [237] P. DeVos, B. DeHaan, J. Pater, et R. VanSchilfgaarde, « Association between capsule diameter, adequacy of encapsulation, and survival of microencapsulated rat islet allografts », *Transplantation*, vol. 62, n°. 7, p. 893-899, oct. 1996.
- [238] R. Lehmann, R. A. Zuellig, P. Kugelmeier, P. B. Baenninger, W. Moritz, A. Perren, P.-A. Clavien, M. Weber, et G. A. Spinas, « Superiority of small islets in human islet transplantation », *Diabetes*, vol. 56, n°. 3, p. 594-603, mars 2007.
- [239] E. S. O'Sullivan, A. S. Johnson, A. Omer, J. Hollister-Lock, S. Bonner-Weir, C. K. Colton, et G. C. Weir, « Rat islet cell aggregates are superior to islets for transplantation in microcapsules », *Diabetologia*, vol. 53, n°. 5, p. 937-945, mai 2010.
- [240] S. Sakai, C. Mu, K. Kawabata, I. Hashimoto, et K. Kawakami, « Biocompatibility of subsieve-size capsules versus conventional-size microcapsules », *J Biomed Mater Res A*, vol. 78, n°. 2, p. 394-398, août 2006.



## Bibliographie

---

- [241] C. A. Hoesli, R. L. J. Kiang, D. Mocinecová, M. Speck, D. J. Mošková, C. Donald-Hague, I. Lacík, T. J. Kieffer, et J. M. Piret, « Reversal of diabetes by  $\beta$ TC3 cells encapsulated in alginate beads generated by emulsion and internal gelation », *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 100B, n<sup>o</sup>. 4, p. 1017–1028, 2012.
- [242] H. Song, D. L. Chen, et R. F. Ismagilov, « Reactions in Droplets in Microfluidic Channels », *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 45, n<sup>o</sup>. 44, p. 7336-7356, nov. 2006.
- [243] Y.-C. Tan, J. S. Fisher, A. I. Lee, V. Cristini, et A. P. Lee, « Design of microfluidic channel geometries for the control of droplet volume, chemical concentration, and sorting », *Lab on a Chip*, vol. 4, n<sup>o</sup>. 4, p. 292, 2004.
- [244] J. Clausell-Tormos, D. Lieber, J.-C. Baret, A. El-Harrak, O. J. Miller, L. Frenz, J. Blouwolff, K. J. Humphry, S. Köster, H. Duan, C. Holtze, D. A. Weitz, A. D. Griffiths, et C. A. Merten, « Droplet-Based Microfluidic Platforms for the Encapsulation and Screening of Mammalian Cells and Multicellular Organisms », *Chemistry & Biology*, vol. 15, n<sup>o</sup>. 5, p. 427-437, mai 2008.
- [245] J. F. Edd, D. Di Carlo, K. J. Humphry, S. Koster, D. Irimia, D. A. Weitz, et M. Toner, « Controlled encapsulation of single-cells into monodisperse picolitre drops », *Lab Chip*, vol. 8, n<sup>o</sup>. 8, p. 1262-1264, août 2008.
- [246] E. W. M. Kemna, R. M. Schoeman, F. Wolbers, I. Vermes, D. A. Weitz, et A. van den Berg, « High-yield cell ordering and deterministic cell-in-droplet encapsulation using Dean flow in a curved microchannel », *Lab on a Chip*, vol. 12, n<sup>o</sup>. 16, p. 2881, 2012.
- [247] F. Rivera, Berthier, J, et S. Le Vot, « Microfluidic device system and method for controlled encapsulation of particles or particles cluster », U.S. Patent FR 08 02578.
- [248] R. Lin, J. S. Fisher, M. G. Simon, et A. P. Lee, « Novel on-demand droplet generation for selective fluid sample extraction », *Biomicrofluidics*, vol. 6, n<sup>o</sup>. 2, p. 024103-024103-10, avr. 2012.
- [249] H. Tsutsui et C.-M. Ho, « Cell separation by non-inertial force fields in microfluidic systems », *Mech. Res. Commun.*, vol. 36, n<sup>o</sup>. 1, p. 92-103, janv. 2009.
- [250] J. Takagi, M. Yamada, M. Yasuda, et M. Seki, « Continuous particle separation in a microchannel having asymmetrically arranged multiple branches », *Lab on a Chip*, vol. 5, n<sup>o</sup>. 7, p. 778, 2005.
- [251] C.-H. Yang, Y.-S. Lin, K.-S. Huang, Y.-C. Huang, E.-C. Wang, J.-Y. Jhong, et C.-Y. Kuo, « Microfluidic emulsification and sorting assisted preparation of monodisperse chitosan microparticles », *Lab Chip*, vol. 9, n<sup>o</sup>. 1, p. 145-150, janv. 2009.
- [252] H. Maenaka, M. Yamada, M. Yasuda, et M. Seki, « Continuous and Size-Dependent Sorting of Emulsion Droplets Using Hydrodynamics in Pinched Microchannels », *Langmuir*, vol. 24, n<sup>o</sup>. 8, p. 4405-4410, avr. 2008.
- [253] S.-H. Hung, Y.-H. Lin, et G.-B. Lee, « A microfluidic platform for manipulation and separation of oil-in-water emulsion droplets using optically induced dielectrophoresis », *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 20, n<sup>o</sup>. 4, p. 045026, avr. 2010.
- [254] F. Guo, X.-H. Ji, K. Liu, R.-X. He, L.-B. Zhao, Z.-X. Guo, W. Liu, S.-S. Guo, et X.-Z. Zhao, « Droplet electric separator microfluidic device for cell sorting », *Appl. Phys. Lett.*, vol. 96, n<sup>o</sup>. 19, mai 2010.
- [255] C.-Y. Lee, Y.-H. Lin, et G.-B. Lee, « A droplet-based microfluidic system capable of droplet formation and manipulation », *Microfluid. Nanofluid.*, vol. 6, n<sup>o</sup>. 5, p. 599-610, mai 2009.

## Bibliographie

---

- [256] T. Franke, A. R. Abate, D. A. Weitz, et A. Wixforth, « Surface acoustic wave (SAW) directed droplet flow in microfluidics for PDMS devices », *Lab on a Chip*, vol. 9, n°. 18, p. 2625, 2009.
- [257] J. Shi, H. Huang, Z. Stratton, Y. Huang, et T. J. Huang, « Continuous particle separation in a microfluidic channel via standing surface acoustic waves (SSAW) », *Lab on a Chip*, vol. 9, n°. 23, p. 3354, 2009.
- [258] J. Nam, H. Lim, D. Kim, et S. Shin, « Separation of platelets from whole blood using standing surface acoustic waves in a microchannel », *Lab Chip*, vol. 11, n°. 19, p. 3361-3364, sept. 2011.
- [259] Nam, J, Lim, H, Kim, C, Kang, J, et Shin, S, « Density-dependent separation of encapsulated cells in a microfluidic channel by using a standing surface acoustic wave », *Biomicrofluidics (USA)*, vol. 6, n°. 2, p. 024120 (10 pp.), juin 2012.
- [260] J. S. Mohammed, Y. Wang, T. A. Harvat, J. Oberholzer, et D. T. Eddington, « Microfluidic device for multimodal characterization of pancreatic islets », *Lab Chip*, vol. 9, n°. 1, p. 97-106, janv. 2009.
- [261] N. D. Lamontagne, « Droplet-based microfluidics reveals dynamics of pancreatic islet secretion », *Anal. Chem.*, vol. 81, n°. 23, p. 9533, déc. 2009.
- [262] K. van Dijke, G. Veldhuis, K. Schroën, et R. Boom, « Parallelized edge-based droplet generation (EDGE) devices », *Lab on a Chip*, vol. 9, n°. 19, p. 2824, 2009.
- [263] A. R. Abate et D. A. Weitz, « Faster multiple emulsification with drop splitting », *Lab on a Chip*, vol. 11, n°. 11, p. 1911, 2011.
- [264] M. B. Romanowsky, A. R. Abate, A. Rotem, C. Holtze, et D. A. Weitz, « High throughput production of single core double emulsions in a parallelized microfluidic device », *Lab on a Chip*, vol. 12, n°. 4, p. 802, 2012.
- [265] E. Rondeau et J. J. Cooper-White, « Formation of multilayered biopolymer microcapsules and microparticles in a multiphase microfluidic flow », *Biomicrofluidics*, vol. 6, n°. 2, juin 2012.
- [266] S.-C. Chang et Y.-C. Su, « On-demand micro-encapsulation utilizing on-chip synthesis of semi-permeable alginate-PLL capsules », *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 10, n°. 6, p. 1165-1174, déc. 2010.
- [267] « MFCS\_user\_manual ». [http://wikisites.mcgill.ca/djgroup/images/5/58/MFCS\\_user\\_manual.pdf](http://wikisites.mcgill.ca/djgroup/images/5/58/MFCS_user_manual.pdf).
- [268] P. Abgrall et A.-M. Gue, « Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem - a review », *J. Micromech. Microeng.*, vol. 17, n°. 5, p. R15-R49, mai 2007.
- [269] R. Seemann, M. Brinkmann, T. Pfohl, et S. Herminghaus, « Droplet based microfluidics », *Rep. Prog. Phys.*, vol. 75, n°. 1, janv. 2012.
- [270] N. Wu, Y. Zhu, S. Brown, J. Oakeshott, T. S. Peat, R. Surjadi, C. Easton, P. W. Leech, et B. A. Sexton, « A PMMA microfluidic droplet platform for in vitro protein expression using crude E. coli S30 extract », *Lab on a Chip*, vol. 9, n°. 23, p. 3391, 2009.
- [271] G. Kotzar, M. Freas, P. Abel, A. Fleischman, S. Roy, C. Zorman, J. M. Moran, et J. Melzak, « Evaluation of MEMS materials of construction for implantable medical devices », *Biomaterials*, vol. 23, n°. 13, p. 2737-2750, 2002.
- [272] « Le collage moléculaire, une technique attractive, CLEFS CEA », 2005.



## Bibliographie

---

- [273] T. G. Tihan, M. D. Ionita, R. G. Popescu, et D. Iordachescu, « Effect of hydrophilic-hydrophobic balance on biocompatibility of poly (methyl methacrylate)(PMMA)-hydroxyapatite (HA) composites », *Materials Chemistry and Physics*, vol. 118, n°. 2-3, p. 265–269, 2009.
- [274] F. Moreau, F. Toti, F. Zobairi, M. Chastre, M. Greget, M. H. Richard, T. Berney, et L. Kessler, « P317 Traitement par corticoïdes d'un rejet cellulaire de greffe d'îlots pancréatiques: intérêt du dosage des microparticules circulantes comme biomarqueurs », *Diabetes & Metabolism*, vol. 38, p. A105, mars 2012.
- [275] « <http://www.retsch-fr.com/fr/produits/broyer/broyeurs-planetaires-a-billes/pm-100/> ». .
- [276] Y. Yan, Z. Zhang, J. R. Stokes, Q.-Z. Zhou, G.-H. Ma, et M. J. Adams, « Mechanical characterization of agarose micro-particles with a narrow size distribution », *Powder Technology*, vol. 192, n°. 1, p. 122-130, mai 2009.
- [277] K.-S. Huang, M.-K. Liu, C.-H. Wu, Y.-T. Yen, et Y.-C. Lin, « Calcium alginate microcapsule generation on a microfluidic system fabricated using the optical disk process », *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 17, n°. 8, p. 1428-1434, août 2007.
- [278] Y.-C. Tan, V. Cristini, et A. P. Lee, « Monodispersed microfluidic droplet generation by shear focusing microfluidic device », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 114, n°. 1, p. 350-356, mars 2006.
- [279] J. Berthier, P. Dalle, F. Rivera, R. Renaudot, S. Morales, P.-Y. Benhamou, et P. Caillat, « The physics of pressure powered micro-flow focusing device for the encapsulation of live cells », in *Technical Proceedings of the 2011 NSTI Nanotechnology Conference and Expo, NSTI-Nanotech 2011*, 2011, vol. 2, p. 458-461.
- [280] G. Fundueanu, C. Nastruzzi, A. Carpov, J. Desbrieres, et M. Rinaudo, « Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods », *Biomaterials*, vol. 20, n°. 1427, p. 1435, 1999.
- [281] R. Calafiore, G. Basta, G. Luca, A. Lemmi, L. Racanicchi, F. Mancuso, M. P. Montanucci, et P. Brunetti, « Standard Technical Procedures for Microencapsulation of Human Islets for Graft into Nonimmunosuppressed Patients With Type 1 Diabetes Mellitus », *Transplantation Proceedings*, vol. 38, n°. 4, p. 1156-1157, mai 2006.
- [282] R. Calafiore, G. Basta, G. Luca, C. Boselli, A. Bufalari, A. Bufalari, M. P. Cassarani, G. M. Giustozzi, et P. Brunetti, « Transplantation of pancreatic islets contained in minimal volume microcapsules in diabetic high mammals », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 875, p. 219-232, juin 1999.
- [283] R. Calafiore, G. Basta, A. Falorni, F. Calcinaro, M. Pietropaolo, et P. Brunetti, « A Method for the Large-Scale Production of Microencapsulated Islets - Invitro and Invivo Results », *Diabetes Nutr. Metab.*, vol. 5, n°. 1, p. 23-29, mars 1992.
- [284] G. S. Korbitt, A. G. Mallett, Z. Ao, M. Flashner, et R. V. Rajotte, « Improved survival of microencapsulated islets during in vitro culture and enhanced metabolic function following transplantation », *Diabetologia*, vol. 47, n°. 10, p. 1810-1818, oct. 2004.
- [285] S. T. Moe, G. Skjaak-Braek, A. Elgsaeter, et O. Smidsroed, « Swelling of covalently crosslinked alginate gels: influence of ionic solutes and nonpolar solvents », *Macromolecules*, vol. 26, n°. 14, p. 3589–3597, 1993.
- [286] Soon-Shiong, « Treatment of type I diabetes using encapsulated islets », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 35, n°. 2-3, p. 259-270, févr. 1999.

## Bibliographie

---

- [287] C. Kantak, S. Beyer, L. Yobas, T. Bansal, et D. Trau, « A 'microfluidic pinball' for on-chip generation of Layer-by-Layer polyelectrolyte microcapsules », *Lab on a Chip*, vol. 11, n° 6, p. 1030, 2011.
- [288] R. D. Sochol, S. Li, L. P. Lee, et L. Lin, « Continuous flow multi-stage microfluidic reactors via hydrodynamic microparticle railing », *Lab Chip*, vol. 12, n° 20, p. 4168-4177, sept. 2012.
- [289] S. Sugiura, T. Oda, Y. Izumida, Y. Aoyagi, M. Satake, A. Ochiai, N. Ohkohchi, et M. Nakajima, « Size control of calcium alginate beads containing living cells using micro-nozzle array », *Biomaterials*, vol. 26, n° 16, p. 3327-3331, juin 2005.
- [290] « <http://www.comsol.com/products/4.2/> ».
- [291] K. W. Oh, K. Lee, B. Ahn, et E. P. Furlani, « Design of pressure-driven microfluidic networks using electric circuit analogy », *Lab on a Chip*, vol. 12, n° 3, p. 515, 2012.
- [292] H. Bruus, *Theoretical Microfluidics*. Oxford University Press, 2008.
- [293] Bahrami, M., Yovanovich, M., et Culham, J.R, « Pressure drop of fully-developed, laminar flow in microchannels of arbitrary cross-section », *Proceedings of ICMM 2005*, 2005.
- [294] E. W. Washburn, « The dynamics of capillary flow », *Physical review*, vol. 17, n° 3, p. 273, 1921.
- [295] L. Capretto, W. Cheng, M. Hill, et X. Zhang, « Micromixing Within Microfluidic Devices », in *Microfluidics*, vol. 304, B. Lin, Éd. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 27-68.
- [296] N.-T. Nguyen et Z. Wu, « Micromixers—a review », *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 15, n° 2, p. R1-R16, févr. 2005.
- [297] C.-Y. Lee, C.-L. Chang, Y.-N. Wang, et L.-M. Fu, « Microfluidic Mixing: A Review », *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 12, n° 5, p. 3263-3287, mai 2011.

---

## ANNEXE

---



***Annexe 1 : Calcul des pertes de charges***

Confidentiel



### ***Annexe 2 : Conférence $\mu$ Flu, 2010 Toulouse (Poster)***

**Flow focusing devices: Correlation between frequency, volume and spacing for droplets of alginate in oil phase**

**P. Dalle<sup>\*1</sup>, J. Berthier<sup>1</sup>, R. Renaudot<sup>1</sup>, S. Morales<sup>1</sup>, N. David<sup>1</sup>, G. Costa<sup>1</sup>, M. Alessio<sup>1</sup>, V. Rat<sup>1</sup>, P. Caillat<sup>1</sup>, P.-Y. Benhamou<sup>2</sup>, F. Rivera<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> CEA-LETI, 17 avenues des Martyrs, 38054 Grenoble, France,

<sup>2</sup> Inserm UMR S 578 + CHU Grenoble, CHU, 38043 Grenoble, France

#### **KEY WORDS**

Flow-focusing device, encapsulation, alginate, frequency, droplet spacing, non-Newtonian fluid

#### **Abstract**

*We report the use of a silicon mFFDs to produce alginate droplets in an oil flow for cell encapsulation applications. We seek to precisely control the size of droplets, to obtain a high emission frequency and a large spacing between droplets to prevent coalescence. The understanding of the relation between these quantities and the inlet pressures is then necessary. In the literature, droplet formation in FFDs is frequently reported and well studied for non-viscous fluids, like water and oil. However, the use of very viscous fluids in the dispersed phase is rather poorly documented. In addition, in this work, surfactants are avoided for cell viability considerations. We first determined experimentally the value of volume  $V_d$ , emission frequency  $f$  and spacing of droplets in a pressure-pressure flow regime diagram; second, we theoretically produced an analytical relation between these three quantities, showing that they are not independent. This relation is verified by the experimental results under the condition that the non-Newtonian behaviour of the alginate flow is taken into account.*

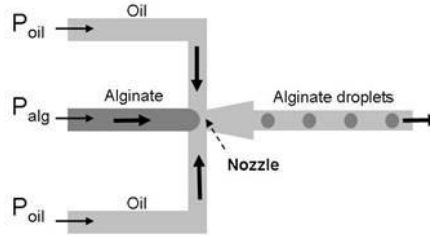
#### **Introduction**

Encapsulation of living cells in micro-porous polymeric matrix has recently gained a great importance in medicine. Applications such as cellular therapies via cell implantation can be quoted [1-3]. Alginates are known to be one of the most suitable materials to form microporous capsules [4]. Alginates are a highly viscous fluid and the formation of precisely controlled capsules is a challenge. From a general standpoint, micro-flow focusing devices (mFFDs) have been found to be a convenient tool for the encapsulation of cells [2,4,5]. This type of microsystem has the ability to produce monodispersed droplets. Size and frequency of droplets are controlled experimentally by the relative flow rate of the dispersed and the continuous phases [6,7]. On one hand, the droplet frequency determines the output rate sufficient to form a large numbers of capsules in a limited time. On the other hand, the volume of the droplets must be adapted to the size of the cells in order to form a coating through which the nutriment can diffuse rapidly. Finally, the spacing between two successive droplets should be sufficient to prevent coalescence of the liquid droplets in the outlet channels before the polymerization stage. Hence the understanding of these characteristic quantities as a function of the inlet pressure conditions is of great importance.

In this work, we consider a flow-focusing device with the same triangular geometry as that of Tan et al. [7] with an alginate solution as the dispersed phase and an oil flow as the continuous phase (fig.1). The mFFD is pressure-driven (highly regulated Fluigent® micro-pumps) which is more convenient for viscous fluid. The flow regimes of such visco-elastic liquids in flow focusing devices (fig.2) have been investigated in a preceding paper [8]. In this paper, we focus on the three characteristic physical outputs in the droplet regime: the droplet frequency, volume and spacing. Such an investigation has already been done with non

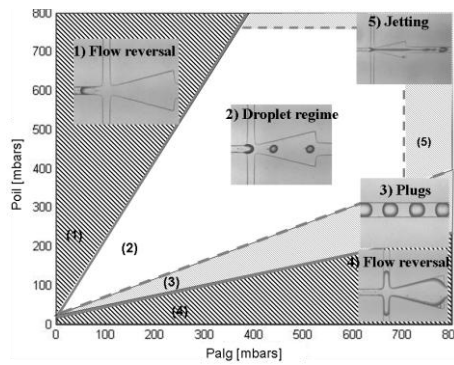
## Annexe 2

viscous fluid (see Ward et al.[9]) but no relation between these parameters has been reported for a highly viscous dispersed phase (~430mPa.s in this report).



**Fig.1:** Schematic of a FFD

In particular, we conclude that droplet volume and spacing do not vary substantially when the ratio between the alginate and oil pressure is kept constant; but the droplet emission frequency increases strongly with the inlet pressures. Secondly, using the analytical flow model developed in [8], we theoretically produce a relation between these three quantities, showing that they are not independent. This relation is helpful to determine the nominal inlet pressures, and proves the importance of the non-Newtonian behavior of the alginate flow.



**Fig.2:** Schematic of flow regimes of a FFD [8]

### Material and methods

The microchip is fabricated using standard lithography techniques; substrate and walls are made of silicon and a glass cover seals the flow channels. The etching depth is 100 $\mu$ m and the cover is sealed by direct bonding. The width of the channels is 100 $\mu$ m and the nozzle is 50 $\mu$ m large. The nozzle has a triangular enlargement (fig.1) 500 $\mu$ m long with a base of 200 $\mu$ m. Walls are silanized to achieve hydrophobic coating to allow the production of aqueous alginate droplets. Oil and alginate solutions are motioned by regulated pressures delivered by micropumps (Fluigent® micro-pumps). The oil phase is a light mineral oil (M5904 from Sigma Aldrich). Alginate Keltone HV (ISP Proviron) solutions is diluted in an aqueous solution of 150mM NaCl, 10mM Hepes adjusted in pH 7,4 with a concentration of 1.25%. Shear viscosity measurements were carried out with a Paar-Physica MCR300 rheometer using a cone plane geometry. At 1.25%, the viscosity obtained at zero shear is 430mPa.s.

Experiments have been conducted for alginate pressure ( $P_i$ ) and oil pressure ( $P_e$ ) varying between 100 and 900 mbars by increments of 100 mbars. The microscope is set up with a pulse LED lighting and images are recorded by a digital camera. Frequency, volume and spacing of droplets are then obtained after image analysis using ImageJ software. Finally, a Matlab interpolation program produces the contour plots in the  $[P_i, P_e]$  coordinates system.

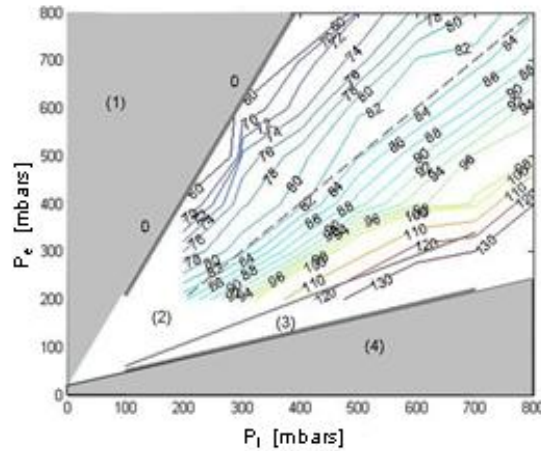


### EXPERIMENTAL RESULTS

#### - Droplet diameter and volume

The diameter ( $L$ ) of the droplet is directly measured with microscope. A contour plot of the diameter in a  $[P_i, P_e]$  coordinates system is shown in fig 3. In the regime (1) the oil pressure is so large that it reverses the alginate flow, and in the regime (4), the alginate pressure is sufficiently large to reverse the oil flow. These regimes appear because we use driving pressures. The domain of interest is the dripping droplet regime (domain 2 in the fig 6), while domain (3) corresponds to plug flows.

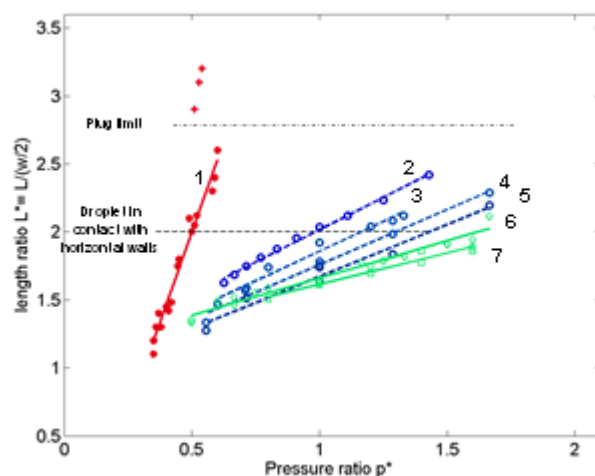
As expected, the diameter of the droplet increases continuously from the flow reversal limit to the plug limit (in our definition, the plug limit corresponds to a droplet which length equals 1.4 times the channel width). It is observed that along any straight line  $p^* = P_i / P_e = \text{cste}$ , the diameter remains constant.



**Fig.3.** Contour plot of the droplet diameter (in  $\mu\text{m}$ ).

This is a general property, valid when the capillary number is sufficiently small. This relation has been verified for flow rate controlled FFDs [9-11] and seems also valid for pressure actuated FFDs [9]. In fact, Ward et al. [9] do not indicate a linear relation because they take into account the plug configuration in their fit (points noted 1 in fig 5). Discarding the points above the plug limit, the droplet sizes align along a linear segment. If we follow the approach of Stone et al. and Garstecki et al. [12-13] based on the time scale for the formation of a droplet, the reduced droplet dimension  $L/w$  (where  $L$  is the diameter of the droplet and  $w$  the width of the channel) is proportional to the flow rate ratio  $q^* = Q_i/Q_e$ . It has been shown in [8] that the ratio  $q^*$  was itself proportional to  $p^* = P_i/P_e$  for a highly viscous dispersed phase. Hence, the ratio of the droplet size to the channel width increases linearly with  $p^*$  i.e.  $L/w \sim p^*$ , in agreement with the experimental results shown in fig 4.

A comparison between the slope of the linear fit and the viscosity ratio is shown in table 1. For some experiments a surfactant (span 80 at 1%) is used to decrease the surface tension. Note the general rule that the slope decreases when the viscosity ratio  $\eta_i/\eta_e$  increases. Obviously there is also an effect of the surface tension between the two liquids, as shown by the comparison between the alginate concentrations of 1.75% with or without surfactant in the oil phase.



**Fig.4.** Reduced length  $L^*=L/(w/2)$  as a function of  $p^*$ : 1—droplets of water in oil [8-11], 2—5: Keltone alginate droplets in oil with surfactant: 2— alginate concentration 1%; 3—alginate concentration 1.25%; 4— alginate concentration 1.50%; 5—alginate concentration 1.75%; 6—7: Keltone alginate droplets in oil without surfactant; 6—alginate concentration 1.25%; 7—alginate concentration 1.75%.

	Liquids	$\eta_i$ (mPa.s)	$\eta_e$ (mPa.s)	$\eta = \eta_i / \eta_e$	Slope
1	water/oil	1	30	1/30	5.7
2	Alginate 1%/ oil (with surfactant)	300	30	10	1.00
3	Alginate 1.25%/ oil (with surfactant)	430	30	14.3	0.83
4	Alginate 1.50%/ oil (with surfactant)	1200	30	40	0.70
5	Alginate 1.75%/ oil (with surfactant)	1800	30	60	0.60
6	Alginate 1.25%/ oil (no surfactant)	430	30	14.3	0.55
7	Alginate 1.75%/ oil (no surfactant)	1800	30	60	0.50

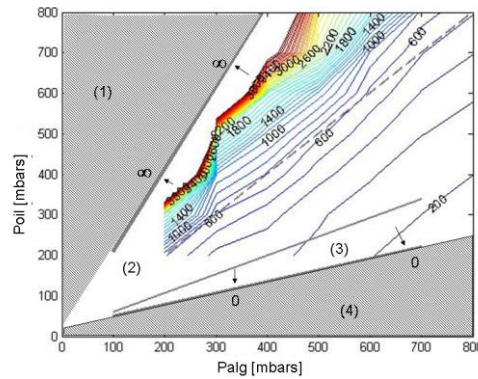
**Table 1.** Values of the slope of the linear fit and the viscosity ratio ( $\eta_i$  is the viscosity of the dispersed phase,  $\eta_e$  that of the continuous phase).

## Annexe 2

So far, we have dealt with apparent diameter of droplets. The important information being the droplet volume, we have to derive the volume from the measurement of the apparent diameter. If the droplet is small enough compared to the channel dimensions, the volume of the droplet ( $V_d$ ) is directly obtained from the apparent diameter  $L$  with the simple formula of the volume of a sphere. But when the droplet is deformed by the upper and lower horizontal walls, at the approach of the plug regime ( $L^* > 2$  in fig.4), the droplet flattens between these two walls (note that the side walls are not of importance since the apparent diameter is measured in the triangular chamber). In this regime, the volume of the droplet can be obtained either by Nie et al. or Berthier correlations [14,15].

### - Droplet spacing

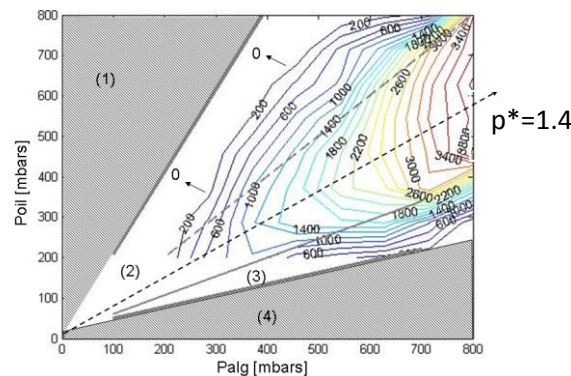
The spacing  $\lambda$  between two successive droplets has an influence on the occurrence of coalescence. The spacing is infinite at the flow reversal condition, and decreases progressively at the limit of the plug regime (fig.5). The spacing is approximately constant along any straight line  $p^* = \text{cste}$ . Note the very steep increase of the spacing at the upper limit of the droplet regime (flow reversal limit) where theoretically the spacing is infinite.



**Fig.5.** Droplet spacing ( $\mu\text{m}$ ) contour plot.

### - Droplet release frequency

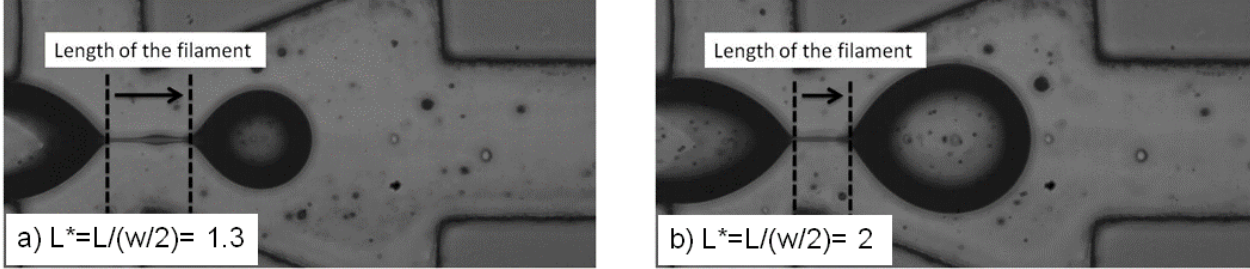
The contour plot of droplet release frequency ( $f$ ) is given in fig 6. As a general rule, the droplet release frequency increases with the inlet pressures. Droplet frequency goes to zero at the flow reversal limits; regime (1), regime (4).



**Fig.6.** Frequency (drop/min) contour plot.(1) Oil invades the alginate channel, (2) Droplet regime, (3) Plug regime, (4) Alginate invades oil channel.

## Annexe 2

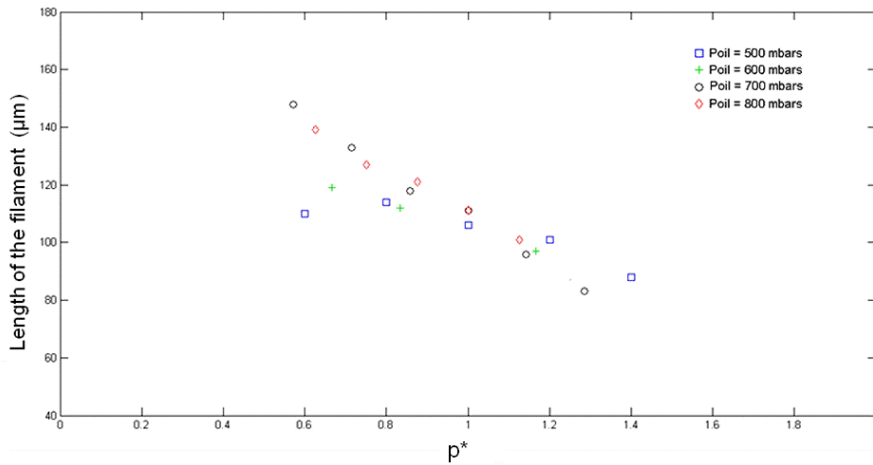
We notice that the locus of largest frequencies is a straight line corresponding to a constant value of  $p^* = P_i / P_e \sim 1.4$ . In order to propose an explanation for this locus, we have to take into account another element of the droplet formation : the alginate filament which linked the droplet to the inlet alginate just before the droplet pinched off (fig 7). We believe that the locus of the largest frequencies results from a competition between the length of this filament at the moment of rupture and the size of the droplet.



**Fig.7.** Length of the filament for different  $p^*$ : a)  $p^*=0.6$  and b)  $p^*=1.3$  just before the filament breakup.

On one hand, it is observed that the length of the filament at the moment of the rupture decreases from the flow reversal regime limit (regime 1) to the plug regime (regime 3), so that the length of the filament decreases when  $p^*$  increases (see fig.7.a and 7.b). The decrease of the filament length versus  $p^*$  has been experimentally observed and is plotted in fig 8.

A short length of the filament at rupture, correspond to a short time for the droplet formation and emission, and consequently to a high frequency. An equivalent explanation is found by analyzing the spacing between the droplets (fig.5) which decreases when  $p^*$  increases.



**Fig.8.** Filament length at the moment of rupture as a function of  $p^*$ : experimental observations performed with a high speed camera (1000 images/second). Alginate concentration is 1.25%.

But, on the other hand, the droplet size increases with  $p^*$  (fig.7.a and 7.b). It is deduced from the fig 3 that indicates the size of the droplet as a function of  $p^*$ , that for a value  $p^*$  between 1.4 and 1.6 (for a 1.25% alginate concentration), the droplet diameter is about 100 $\mu m$ . This corresponds to the limit where the droplet is larger enough to touch the walls (fig 7.b). Indeed for  $p^*>1.4$ , the droplet size induces friction and the droplet emission frequency decreases.

The locus of the highest frequencies in fig 6 is obtained at this limit, corresponding to the shortest filament and a droplet size approximately equal to the channel dimension. The knowledge and the explanation of this locus can be a precious help for our application to produce the maximum capsules in a limited time.

### RELATION BETWEEN DROPLET FREQUENCY, VOLUME AND SPACING

#### - Theoretical considerations

Let us first enounce two characteristic relations using frequency, volume and spacing. The first relation relates the dispersed phase flow rate to the droplet frequency  $f$  and volume  $V_d$

$$Q_i = f V_d \quad (1)$$

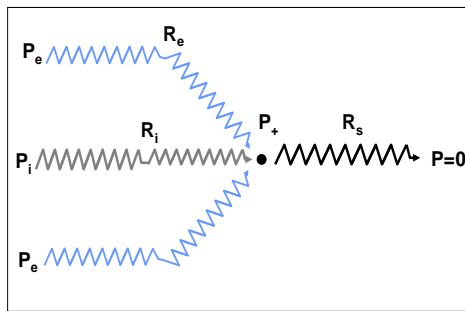
Second, under the assumption that the droplet velocity is the same as the continuous phase velocity in the outlet channel, i.e. if there is no slip velocity between droplet and the continuous phase, which is the case if the droplet is sufficiently large to occupy an important fraction of the channel cross section, the flow velocity in the outlet channel  $U_s$  is linked to the frequency and spacing  $\Delta$  by

$$U_s = f \Delta \quad (2)$$

Now, let us recall the model developed in [8] based on the hydraulic resistances shown in fig 8

$$\begin{aligned} P_e - P_+ &= R_e Q_e \\ P_i - P_+ &= R_i Q_i \\ P_+ &= R_s (2Q_e + Q_i) g(Q_i/Q_e) = R_s Q_s g(Q_i/Q_e) \end{aligned} \quad (3)$$

where  $Q_i$  and  $Q_e$  are respectively the flow rates of the dispersed phase and continuous phase,  $Q_s$  is the flow rate in the outlet channel,  $P_i$  and  $P_e$  are the inlet pressures of the dispersed and continuous phases, and  $R_i, R_e$ , and  $R_s$  are respectively the hydraulic resistances of the alginate inlet channel, oil inlet channels, and device outlet channel. The function  $g$  is a function of the ratio  $Q_i/Q_e$  which takes into account the increase of pressure drop due to the droplet flow in the outlet channel. This model assumes a time averaged pressure  $P_+$  at the nozzle.



**Fig.8.** Schematic of the hydraulic resistances of the different elements of the FFD.

Using (1) and (3), and taking into account the mass conservation equation , we derive

$$Q_s = 2 \frac{P_e - P_i}{R_e} + \left( 1 + \frac{2R_i}{R_e} \right) f V_d \quad (4)$$

Upon substitution of (2)

## Annexe 2

$$f \Delta = \frac{2 \frac{P_e - P_i}{R_e} + \left(1 + \frac{2 R_i}{R_e}\right) f V_d}{w_s d} \quad (5)$$

where  $w_s$  and  $d$  are the width and depth of the outlet channel. Equation (5) is a relation between  $f$ ,  $V_d$  and  $\Delta$  which can be cast under the form

$$V_d = A \Delta - \frac{B}{f} \quad (6)$$

where

$$\begin{aligned} A &= \frac{w_s d}{(1 + 2 R_i / R_e)} \\ B &= \frac{P_e - P_i}{(R_e / 2 + R_i)} \end{aligned} \quad (7)$$

### - Experimental verification

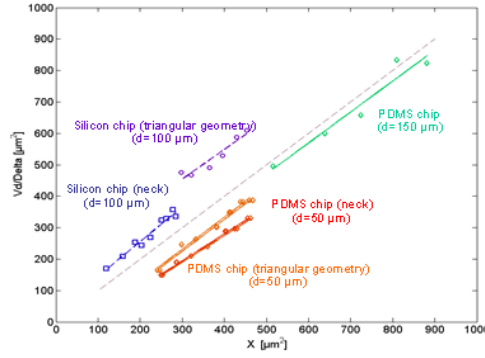
According to the theoretical developments, relation (6) should be valid as soon as the dispersed phase is sufficiently viscous. In this section, we test the validity of relation (6) for 1.25 wt% Keltone alginate solutions in a continuous oil phase for different silicon FFD morphologies: triangular enlargement (presented and used in part 2) and also for neck entanglement, geometry proposed by Anna et al. [6]. The relation is also tested for a microchip with an alternative material: Polydimethyl siloxane (PDMS). All these microsystems have a depth  $d$  of 100  $\mu\text{m}$ . A first experimental verification can be done by considering equal inlet pressures:  $P_i = P_e$ , or  $p^* = P_i / P_e = 1$ . In such a case, the coefficient  $B$  in (7) vanishes and (6) yields

$$V_d = \frac{w_s d}{(1 + 2 R_i / R_e)} \Delta \quad (8)$$

Note that the resistance  $R_i$  is not a constant because of the non-Newtonian nature of the dispersed phase: there is a dependency of the resistance  $R_i$  to the flow rate  $Q_i$  via the shear rate. By approximating the Carreau-Yasuda behavior of the alginate by a power-law (Ostwald fluid), i.e. the viscosity is assumed to be of the form  $\eta = K \dot{\gamma}^n$ , an expression for  $R_i$  as a function of the flow rate in a square channel has been developed based on numerical modeling using the COMSOL numerical program [16]:

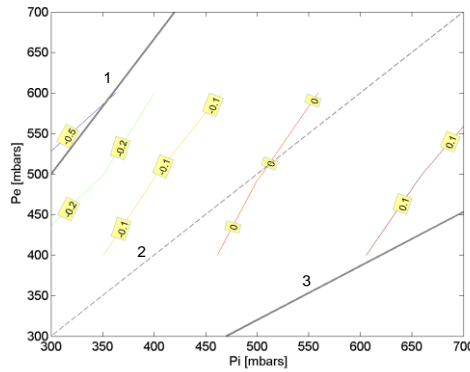
$$R_i = \frac{43.2 L K}{w^2} \left[ 10.8 \frac{Q_i}{w^3} \right]^{n-1} \int_0^{\pi/2} \sin^{2n+1} \theta d\theta \quad (9)$$

This expression is close to that of Muzychka et al. or Kozicki et al. [17,18]. The result is close also to that of Rabinowitsch-Mooney for circular ducts of same hydraulic diameter [19]. Using the same hydraulic diameter, it is shown that expression (9) is 14% smaller than that of a circular duct. Upon substitution in (8) of the hydraulic resistances calculated with (9) for different flow rates, we find the fig 9 where the ratio  $X = w_s d / (1 + 2 R_i / R_e)$  has been plotted as a function of  $V_d / \Delta$ . The different points align reasonably well with the diagonal, taking into account the uncertainty on the non-Newtonian shear viscosity and on the pressure drop in the different connecting channels.



**Fig.9.** Plot of  $V_d/\Delta$  as a function of  $X = w_s d / (1 + 2 R_i / R_e)$  for different types of FFDs at  $p^*=1$ . The different experimental points form lines parallel to the diagonal. In theory, they all should be located on the diagonal itself.

Finally a verification is done for  $P_i \neq P_e$  ( $p^* \neq 1$ ) for the silicon chip with the triangular geometry. The percentage error of the analytical relation is shown in fig. 10, representing the relative variation of the function  $F(V_d, \Delta, f) = V_d - A\Delta + B/f$  for different inlet pressures  $P_i$  and  $P_e$ . The results are scaled by the maximum of the function  $F$ .



**Fig 10.** Plot of the relative deviation of the (6) relation. The 1, 2, 3 lines represented the reversal limit, the diagonal and the plug limit respectively.

Near the  $P_i = P_e$  line the relation is well verified. The deviation increases from 10% to 50% at the flow reversal limit. This can be partly due to errors in measurements of  $\Delta$  because of its important increase close to the flow reversal limit, regime 1 (fig.5). The results are satisfactory at the plug regime limit (approximately 10%). Note that expression (6) does not take into account the excess pressure drop of the plug regime.

In conclusion, expression (6) developed using a simplified model of the droplet formation in mFFDs, describes well the phenomena near the  $P_i \neq P_e$  line, and with some approximation at the boundaries of the droplet regime.

### CONCLUSIONS

Actuating micro flow focusing devices by micropumps is convenient to achieve very high droplet monodispersity and to manipulate highly viscous fluid. These device are convenient for cell encapsulation applications. In this report, we have characterized all of the parameters outputs of our mFFD silicon device in function of the inlet pressures. These three observable outputs—droplet release frequency, droplet spacing and droplet dimension—have been experimentally determined and plotted in a  $[P_i, P_e]$  coordinates system. It has been shown that these three quantities are not independent, and a relation between them has been



derived. The present study aims at facilitating the dimensioning of FFDs and the choice of the actuation conditions for the many different applications in biotechnology, especially in cell encapsulation where the size, the frequency and the space must be precisely chosen and controlled.

### REFERENCES and Citations

- [1] P. De Vos, M.M. Faas, B. Strand, R. Calafiore, "Alginate-based microcapsules for immuno-isolation of pancreatic islets", *Biomaterials*, 27 (2006) 5603–5617.
- [2] S. Le Vot, J. Berthier, N. David, D. Freida, A. Fuchs, P.Y. Benhamou, F. Rivera, "Microfluidic device for alginate-based cell encapsulation," *Proceedings of the XVI International Conference on Bioencapsulation*, Dublin, Ireland ; 4-6 September 2008.
- [3] A. Katsen-Globa, P. Feilen, F. Ehrhart, M. M. Weber, H. Zimmermann, "Alginate encapsulation improves viability and integrity of cryopreserved pancreatic islets and multicellular spheroids: combined fluorescence, scanning and block-face scanning electron microscopy," *Microsc. Microanal.* 13 (Suppl 3), 2007
- [4] V.L. Workman, S.B. Dunnett, P. Kille, D.D. Palmer, "Microfluidic chip-based synthesis of alginate microspheres for encapsulation of immortalized human cells," *Biomicrofluidics*, 1: p. 014105.
- [5] V.L. Workman, "On-Chip alginate microencapsulation of functional cells," *Macromol. Rapid Commun.* 29 (2008) 165–170.
- [6] S.L. Anna, N.B., and Howard A. Stone, "Formation of dispersions using "flow focusing" in microchannels", *Applied Physics letters*, 2003. 82(3).
- [7] Y. Tan, V.C., Abraham P.Lee, "Monodispersed microfluidic droplet generation by shear focusing microfluidic device", *Sensors and Actuators B*, 2006, 114(350-356).
- [8] J. Berthier, S. Le Vot, P. Tiquet, N. David, D. Lauro, P.Y. Benhamou, F. Rivera, "Highly viscous fluids in pressure actuated flow focusing devices," *Sensors and Actuators A: Physical*, advance article, 2010.
- [9] T. Ward, M. Faivre, M. Abkarian, H. A. Stone, "Microfluidic flow focusing: drop size and scaling in pressure versus flow-rate-driven pumping," *Electrophoresis*, Vol. 26, pp. 3716-3724, 2005
- [10] P. He, D. Barthès-Diesel, E. Leclerc, "Flow of two immiscible liquids with low viscosity in Y shaped microfluidic systems: effect of geometry," *Microfluid. Nanofluid.* p. 10.1007, 2009.
- [11] G.F. Christopher, S.L. Anna, "Microfluidic methods for generating continuous droplet streams," *J. Phys. D* 40, R319-R336, 2007.
- [12] H.A. Stone, A.D. Strook, A. Ajdari, "Engineering flows in small devices: microfluidics towards a lab-on-chip," *Lab Chip*, 36, pp. 381-412, 2004.
- [13] P. Garstecki, M.J. Fuerstman, H.A. Stone, G. Whitesides, "Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction: scaling mechanism and break-up," *Lab Chip*, 6, pp. 437-446, 2006.
- [14] Z. Nie, M. Seo, S. Xu, P.C. Lewis, M. Mok, E. Kumacheva, G.M. Whitesides, P. Garstecki, H.A. Stone, "Emulsification in a microfluidic flow-focusing device: effect of the viscosities of the liquids," *Microfluid. Nanofluid.* 5, pp.585–594, 2008.
- [15] J. Berthier. "Microdrops and Digital Microfluidics". William Andrew Publishers, 2009.
- [16] J. Berthier. "COMSOL assistance for the determination of pressure drops in complex microfluidic channels", *Comsol Conference 2010*, Paris, 17-19 November 2010.
- [17] Y. S. Muzychka and J. Edge, "Laminar Non-Newtonian Fluid Flow in Noncircular Ducts and Microchannels," *Journal of Fluids Engineering*, Vol. 130, n°11, 111201, p. 2008
- [18] W. Kozicki, C.H. Chou, C. Tiu, "Non Newtonian flow in ducts of arbitrary cross sectional shape", *Chem. Eng. Sci.* 21 (1966) 665–679.
- [19] J.F. Steffe. "Rheological methods in food process engineering", Second Edition, Freeman Press, 1982.



## Annexe 3 : Conférence Bioencapsulation, 2011 Amboise (Oral)

### Human pancreatic islet encapsulation in microfluidic device

Dalle P.<sup>1#</sup>, Morales S.<sup>1</sup>, Persoons V.<sup>2</sup>, Richard M-J.<sup>2</sup>, De Fraipont F.<sup>2</sup>, Lauro D.<sup>1</sup>, Boizot F.<sup>1</sup>, Costa G.<sup>1</sup>, Berthier J.<sup>1</sup>, Caillat P.<sup>1</sup>, Benhamou P-Y.<sup>3\*</sup>, Rivera F.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>CEA-LETI - 38054 Grenoble Cedex 9, France,

<sup>2</sup>DBTP Unité Mixte Thérapie Cellulaire et Tissulaire - 38000 Grenoble, France,

<sup>3</sup>Inserm UMR S 578, CHU - 38043 Grenoble, France.

### INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Transplantation of human pancreatic encapsulated islets appears to be a new promising therapy for a long term treatment of the type 1 diabetes (Calafiore 2006). First studies (De Vos 2006) have demonstrated that the success of islet grafting depends on two main issues; first, the biocompatibility of the micro-porous capsule (mainly composed of alginate); second, the encapsulation process which can damage islets before implantation.

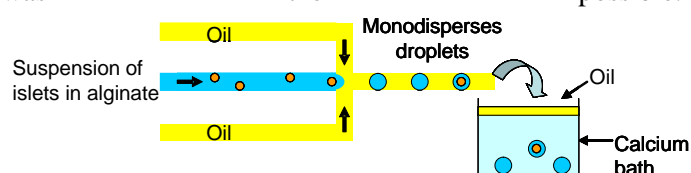
Standard encapsulation techniques are using dripping methods combined with an external gelation of alginate (Prüsse 2008). But other methods are in progress. For instance, micro-flow focusing devices which allow the production of monodispersed droplets from an aqueous phase into a continuous organic flow can also be employed for cell encapsulation (Le Vot 2008).

In this paper, we present, to our knowledge for the first time, the encapsulation of human pancreatic islets with a microfluidic device and an external gelation procedure. Viability and insulin secretion of islets were assessed for respectively ten and three days after our encapsulation process. Results showed no toxicity: encapsulated human islets were viable and kept their functionality.

### MATERIALS AND METHODS

#### Microfluidic device fabrication

Microfluidic device was fabricated using standard lithography techniques. Substrate and walls were made of silicon and a glass cover seals the flow channels. The channel depth and width were 500µm. The nozzle had a 2mm long triangular enlargement with a base of 500µm (figure 1). Walls were silanized to achieve hydrophobic coating (water contact angle: 108-110°). Production of aqueous alginate droplets without the use of surfactant was then possible.



**Figure 1: Formation of droplet in our microsystem**

Before the experiments, the chip was sterilized by injecting 70% ethanol for 10 minutes, 1% Penicillin for 10 minutes, and finally deionized water for 10 minutes.

#### Islets culture

Two days after isolation, human pancreatic islets were kindly provided by the Dr Richard's team from the French Blood Establishment (St Ismier, France). The amount of provided islet was 20000 Islet equivalents (IEQ), corresponding to approximately 4500 islets with different size and shape. The purity grade was 90%.

Culture medium used before and after islet encapsulation was composed of CMRL (Gibco 21530), 1% Penicillin, 2.5% Hepes 1M, 2.5% bicarbonate Na, 1% pyruvate Na 100mM, 10% FBS (Biowest-S1810).

#### Procedure of encapsulation

Super refined soybean oil (CRODA EP-NP-LQ-(MH)), was used as continuous phase. The encapsulation polymer was a 2% (w/w) Pronova SLG 100 alginate from Novamatrix (271108/3). Alginate was prepared in an aqueous solution of 150 mM NaCl, 10mM Hepes. The pH of the alginate solution was adjusted to 7.4. Oil and alginate solutions were motioned by regulated pressures delivered by micropumps (Fluigent® micro-pumps MFCS-8C). Pressure of oil and alginate were fixed respectively to 400 mbars and 450 mbars. External gelation time was fixed to 5 minutes, in a solution composed of 100mM CaCl<sub>2</sub>, 80mM NaCl, 10mM Hepes. Then, capsules were washed three times with culture medium before being stored into a 37°C incubator supplemented by 5% CO<sub>2</sub>.

#### Measurements of islet functionality

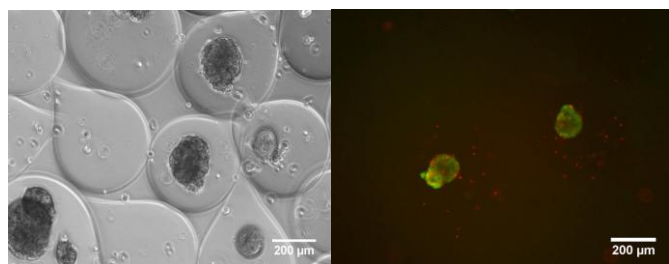
The viability of islets was determined by a live and dead fluorescence test. Viable cells were stained with a solution of 0,67 µM fluorescein diacetate (FDA) and dead cells with a solution of 4µM Propidium iodure (PI). Stained cells were visualized using a fluorescent microscope (Axioplan 2 Imaging Zeiss, software used Cell A). Images analysis was performed using Image J software (Open source software). A home-made program calculates the magnitude of PI (green) and FDA (red) fluorescent signals. The viability rate was determined to be the ratio of PI signal over the total (PI+FDA) fluorescence signal. Islets were considered to be viable for a ratio superior to 50%. Viability assessment was performed for 10 days after encapsulation on at least 45 islets each day.

An insulino secretion test (Elisa, Mercodia 10-1250-01) was done to assess the islet functionality for three days after encapsulation. Nonencapsulated and encapsulated islets were sequentially incubated for 2 hours into low (LGS, 0.8g/L) and high (HGS, 4g/L) glucose concentration buffers. Glucose buffers were prepared from a Krebs Ringer buffer (0.5% of BSA) supplemented with glucose. After incubations, supernatants were sampled. Islets were then stored for one night at 4°C in a 95% Ethanol and 1.5% HCl solution in order to extract the total amount of insulin. The test was done in triplicate and each test was performed on 20 islets. Samples were stored at -20°C before being assayed.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Capsule production

The average capsule diameter is 460µm (CV<5%) with a characteristic form of tears (figure 2). This form is characteristic to the external gelation (Capretto 2008).

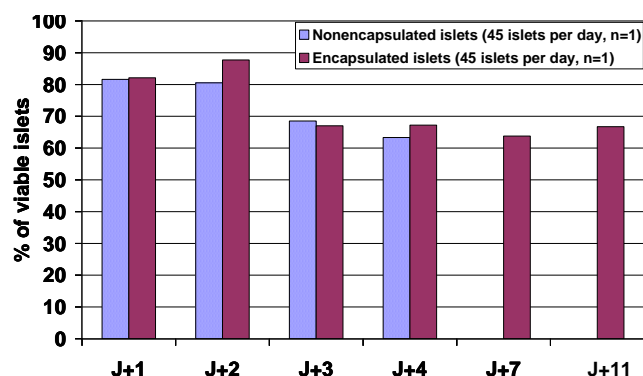


**Figure 2: Humans islets encapsulated with a MFFD**

Microfluidic device does not overcome empty capsule problem. For an initial concentration of 8000 islets/ml of alginate, 55% of the capsules are empty. In the other 45% of capsules, 80% contain one islet and 20% contain more than one (mainly 2, but up to 4). Less than 1% of these capsules lead to islet protrusion.

### Viability

Viability was assessed for a 10-day period after encapsulation (figure 3). 10% (500 islets) of the pancreatic islets batch were kept as reference (nonencapsulated islets).



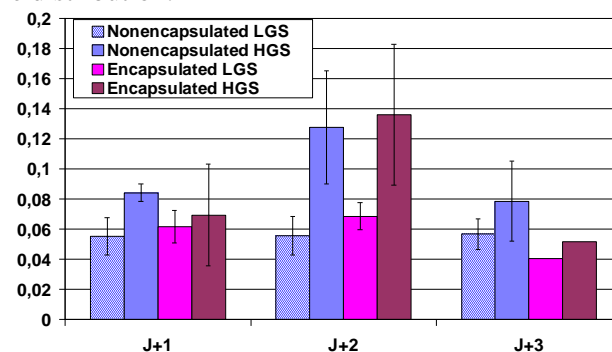
**Figure 3: Viability of islets after encapsulation**

After 6 days no more nonencapsulated islets are alive whereas 60% of encapsulated islets present more than

50% of viable cells.

### Insulino secretion

Figure 4 shows the insulin secretion ratio for nonencapsulated and encapsulated islets. This ratio is defined as the amount of secreted insulin for low and high glucose stimulation over the total amount of extracted insulin. This normalization overcomes islets size distribution.



**Figure 4: Islet functionality after encapsulation**

Results show that this ratio is quite the same for nonencapsulated or encapsulated islets, meaning that capsules produced by our device have the same porosity properties as capsules coming from standard techniques. However, an important variability is observed in our measurements. Lack of islet does not allow us to carry on other experiments.

## CONCLUSIONS

We demonstrate that viability and functionality of human pancreatic islets are not affected by an encapsulation into a microfluidic device. Microfluidic systems are promising for islet and cell encapsulation since all the process can be automated (size sorting of islets, gelation process) on the same chip at a reduced scale.

## REFERENCES

- Calafiore et al. (2006) *Standard Technical Procedures for Microencapsulation of Human Islets for Graft into Nonimmunosuppressed Patients With Type 1 Diabetes Mellitus*. Transplantation Proceedings, 38, 1156–1157
- De Vos P. et al. (2006) *Alginate-based microcapsules for immuno-isolation of pancreatic islets*. Biomaterials, (27) 5603–5617.
- Prüsse et al. (2008) *Comparison of different technologies for alginate beads production*. Chemical Papers 62 (4) 364–374
- Le Vot S. et al. (2008) *Microfluidic device for alginate-based cell encapsulation*. Proceedings of the XVI International Conference on Bioencapsulation, Dublin, Ireland
- Capretto L. et al. (2008) *Effect of the gelation process on the production of alginate microbeads by microfluidic chip technologie*. Lab on a chip (8) 617–621

## Annexe 4 : Conférence Nanotech, 2012 Santa Clara (Oral)

### New microfluidic chip for the production of spherical gelled capsules for cell encapsulation

P. Dalle\*, S. Morales\*, J. Berthier\*, P-Y. Benhamou\*\*, A. Bellemin Comte\*, F. Boizot\*, G. Costa\*, F. Rivera\*

\*CEA-LETI, Department of Biotechnology, 17, Avenue des Martyrs, 38054 Grenoble, France

\*\* INSERM U1055, University Joseph Fourier, CHU Grenoble, 38043 Grenoble, France

#### ABSTRACT

In this paper, we report a novel microfluidic device for cell encapsulation application. This device couples a monodisperse emulsion of alginate made with an MFFD geometry with a phase transfer device that extracts 100% of the alginate droplets from oil into an aqueous gelling phase. First the phase transfer device is described, followed by an optimization of the gelation process in order to retrieve spherical and monodisperse alginate droplets.

**Keywords:** alginate, encapsulation, pancreatic cells, microfluidic, biphasic flow, MFFD, transfer device.

#### 1 INTRODUCTION

Implantation of Langerhans islet in alginate shell is an alternative for the treatment of diabetes type 1. Finding an adapted process for cell encapsulation is a challenge. The process must produce spherical and monodisperse capsules in a limited time with a good reproducibility [1][2]. Up to now conventional systems are mainly manual which induces batch disparities and do not provide repeatable clinical results. This novel device is the first step towards a full automated and reproducible process for cell encapsulation.

The device—represented in Figure 1—is divided in four sections. Section 1 is composed of a typical MFFD [3] device, which produces an alginate monodisperse emulsion. Two channels are added to inject calcium acetate crystals suspended in oil as proposed by Zhang et al. [4].

Acetate calcium is used to begin the gelation of the droplet before crossing the oil/aqueous phase interface; this process may be called pre-gelling step.

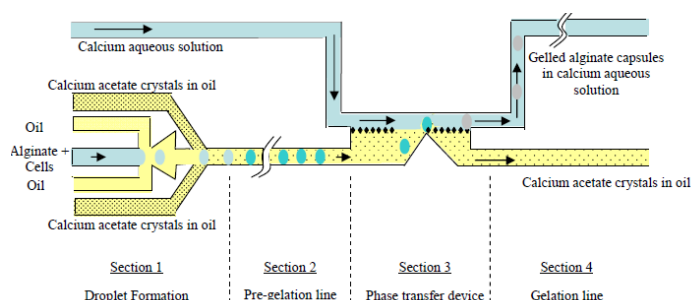


Figure 1: Schematic presentation of the device

Section 2 defines the pre-gelation stage which will be described later on. Basically, the length of the channel is fixed but the inlet pressure of oil determines the duration of the pre-gelation process.

Section 3 depicts a phase transfer device in which the oil and the aqueous calcium flows formed an interface crossed by pre-gelled alginate droplets [5]

Complete gelation of the capsule is achieved in section 4.

In this paper, we will focus on one of the main constraints for cell encapsulation application which is the sphericity of the capsule. First, the phase transfer mechanism will be described and detailed. Critical steps to preserve the droplet sphericity are pointed out. Finally, an optimization of the pre gelation process will be assessed to guarantee the sphericity of the retrieved capsules.

#### 2 MATERIAL AND METHOD

##### 2.1 Microsystem

Microfluidic chips are made in silicon, channels are 200µm large and depth. The size of the droplets formed with the MFFD range from 130µm to 160µm. In the phase transfer chamber, upstream and downstream micropillar rows and a deflector (Figure 2) are defined by deep dry etching technology.

Finally, walls are coated with an hydrophobic coating (water contact angle: 108-110°), to produce aqueous alginate droplets without using additional surfactants.

##### 2.2 Experimental Bench

Solutions are motioned by regulated pressures between 0 to 1bar, delivered by micropumps (Fluigent® micro-pumps MFCS-8C). For all the experiments, the same pressures have been used either for oil or oil supplemented with calcium crystals. Experiments are visualized under a x5 objective microscope and image sequences acquired with a high speed camera (Mikrotron GmbH, MotionBlitz Eosens) up to 5000fps.

### 2.3 Preparation of the solution

The alginate solution used for these experiments is a 3% (w/w) ultra-pure alginate (Pronova SLG100, Novamatrix), diluted in an aqueous solution of 150mM NaCl, 10mM Hepes. The pH is adjusted to 7.4. Viscosity of alginate solution is 5300mPa.s at zero shear. Hyper-refined soybean oil (CRODA EP-NP-LQ-(MH)) is used as continuous phase and calcium acetate organic salt (Macco Organiques INC) as pre-gelling agent. Crystals diameter is around 100 $\mu$ m, which is too large to flow correctly into the device. Crystals grinding is performed to reduce their size. Final calcium acetate crystals diameter ranges from 5 $\mu$ m to less than 1 $\mu$ m. Finally, the solution is diluted to obtain a concentration of 1% or 3% (w/w). The gelling phase is a solution of 100mM CaCl<sub>2</sub>, 80mM NaCl et 10mM Hepes adjusted to pH 7,4.

### 2.4 Parameter fo circularity

Capsule sphericity is assessed for 50 capsules in each condition via image analysis with ImageJ software [6] through two parameters : the circularity and the aspect ratio of the capsule's fitted ellipse. They are calculated as :

$$c = 4\pi \frac{Area}{Perimeter^2} \quad (1)$$

$$r = \frac{MajorAxis}{MinorAxis} \quad (2)$$

For a perfect circle the values of these both parameters is 1.

## 3 PHASE TRANSFER DEVICE

### 3.1 Phase transfer device description

The phase transfer device is composed of two parallel channels separated by upstream and downstream micropillar rows (Figure 2). Calcium and oil flow respectively in the upper and lower channel. A deflector is defined in the oil channel. Micropillar rows and deflector are respectively involved in the stabilization of the oil/calcium interface and the deviation of droplet from oil to aqueous phase. This device continuously transfers the incoming pre-gelled droplets in the following sequence.

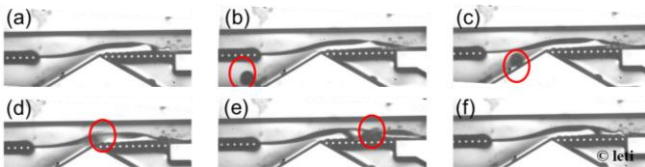


Figure 2 : Phase transfer device functioning

### 3.2 Interface position

The position and stabilization of the oil/calcium interface depend on the input pressures. Figure 3 depicts the position of the interface for different pressure of calcium. For given oil and alginate pressures respectively fixed at 500mbars and 470mbars, the interface position is shown for pressures of calcium ranging from 350mbars to 700mbars.

When  $P_{calcium}$  is fixed at 350mbars, the interface does not grip the pillars row. A thin film of oil flows into the calcium channel, leading to channel pollution.

For  $P_{calcium} = 450$ mbars, the interface starts gripping the pillars. For higher pressures, the interface grips pillars closer from the deflector, which reduces the oil passage. The interface remains stable for  $P_{calcium}$  ranging from 450mbars to 700mbars. The  $P_{oil}$  and  $P_{calcium}$  couple has to be chosen properly as it can influence the transfer mechanism performance.

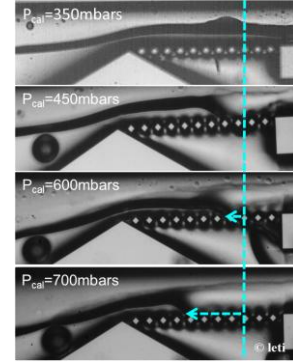


Figure 3: Interface position for different pressures of calcium

### 3.3 Phase transfer

The images sequence in Figure 2 illustrates the transfer of a pre-gelled droplet. First, the interface is kept stable (a) then the continuously incoming capsules are forced to leave the oil phase to join the aqueous phase with a deflector (b, c). Oil is evacuated through micro pillars while the alginate capsule crosses into the aqueous phase (d-e) and finally flows in the gelling phase (f).

The graph in figure 4 shows the evolution of the velocity of three pre-gelled droplets in function of their position in the phase transfer chamber. This position  $x$  on the abscissa corresponds to a position on the micro pillars row drawing in blue. Each picture illustres one step of the transfer mechanism which is described as follow :

- 1-The droplet entrance in the biphasic chamber with the same velocity as the oil, around 0.01m/s ( $x = 0$  to 100 $\mu$ m).
- 2-The droplet is deviated by the deflector and arrives in front of the calcium flow. In this step the droplet is accelerated up to 0.08m/s since the oil flow section is reduced ( $x = 100\mu$ m to 200 $\mu$ m) and keeps a high velocity in the micro pillars closed to the deflector ( $x = 200\mu$ m to 300 $\mu$ m).
- 3- The droplet slows down as it moves to the further micro pillars ( $x = 300\mu$ m to 500 $\mu$ m) and may stop ( $V = 0$  m/s for  $x = 500\mu$ m to 650 $\mu$ m)
- 4-The pre-gelled droplet coalesces with the gelling phase ( $x = 650\mu$ m to 800 $\mu$ m)
- 5-Capsule formed flows in the calcium. A streak of oil in the calcium channel testifies the droplet transfer.

Steps 3 and 4 correspond to the longest steps of the transfer. These steps take around 22ms whereas the global transfer lasts approximatively 30ms. This long process corresponds to the draining time of the oil layer surrounding the pre-gelled droplet. Until the droplet coalesces with the gelling phase, the interface pushes the pre-gelled droplet toward the pillars to progressively reduce the oil layer.



Depending on the pre-gelation state of the droplet, these steps can be critical for the sphericity of the droplet.

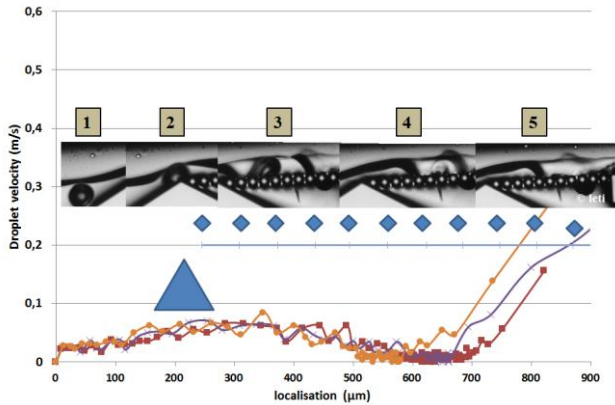


Figure 4 : Evolution of the velocity of the droplet in function of the localisation in the chamber.

## 4 SPHERICITY OPTIMISATION

### 4.1 Monodisperse droplet regime

Different flow regimes are observed in a classical MFFD. A map of the flow regimes has been previously determined for high viscosity alginate [7]. For cell encapsulation application, the monodisperse droplet regime is required. In Figure 5, the blue area represents the phase diagram of a five channels MFFD corresponding to the monodisperse droplet regime (pressure of oil and pressure of oil supplemented with calcium crystal are equal). The red area corresponds to the monodisperse droplet regime of a five branches MFFD coupled to the phase transfer device.  $P_{\text{calcium}}$  is fixed at 450 mbars. The formation of monodisperse droplet is restricted to a thinner area of pressures. This is mainly due to the addition of fluidic connections and the restriction of oil flow inside the phase transfer device. Both result in an increase of the global hydraulic resistance of the device.

We observe that the lower limit (red dotted line) of the monodisperse formation for the transfer device is not a flow reversal limit. Increasing  $P_{\text{alginate}}$  pressure reduces the inter spacing between droplets [8] which induces coalescence in the section 2 and finally blocks the system.

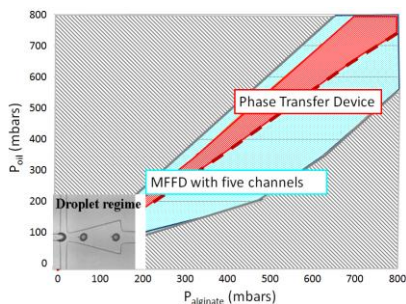


Figure 5: Phase diagram of the phase transfer device

### 4.2 Pre-gelation optimization

We previously demonstrated [9] that the pre-gelation step is necessary to transfer the alginate droplet from the oil to the calcium phase. The concentration of the pre-gelling agent and the contact time between the droplet and the pre-gelling agent

are the main parameters to optimize to preserve the droplet sphericity.

First, the influence of the pre-gelling agent concentration on the sphericity is evaluated. The pre-gelation time is fixed to 15s corresponding to a pressure of oil of 500mbars. Two concentrations of calcium acetate crystals are tested : 1% and 3%.

Figure 6-a shows an images sequence obtained for a 1% concentration of pre-gelling agent which confirms the impact of the interface on the pre-gelled droplet during the oil draining step. The droplet is flattened and its minimum radius is 30% reduced. It results in ellipsoidal capsules (Figure 7-a). Figure 6-b shows an images sequence obtained for a 3% concentration of pre-gelling agent, no deformation of the pre-gelled droplet is measurable and droplets are spherical ( Figure 7-b).

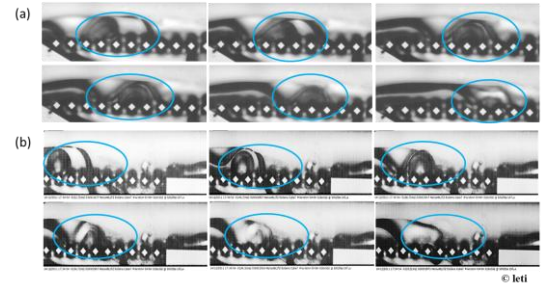


Figure 6- (a) Deformation of a 1% pre-gelled droplet (b) Deformation for a 3% pre-gelled droplet

The circularity parameters are evaluated for both concentrations (Figure 8). 3% pre-gelling agent concentration provides both the higher circularity and the lower aspect ratio. Both parameters are closed from the perfect circle value. The aspect ratio measurement seems to be more significant as it better shows the shape changes.

A 3% concentration is appropriate for this process.

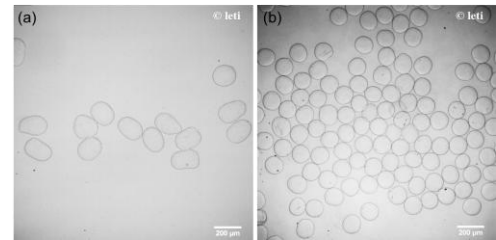


Figure 7- (a) Ellipsoidal capsules 1% (b) Spherical capsules 3%

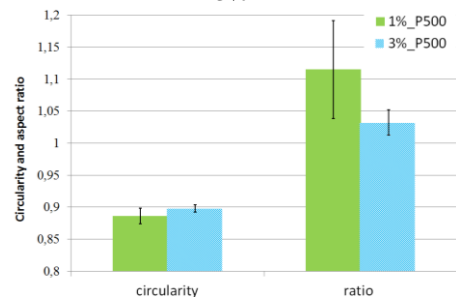


Figure 8 : Evolution of the capsule shape for different concentrations of the pre-gelling agent.

Then, the influence of the pre gelation time is assessed by varying the pressure of oil for a fixed 3% concentration of pre-gelling agent and a fixed channel length. Different pre-gelation time of 15s, 10s and less than 5s corresponding respectively to pressures of 500mbars, 700mbars and 900mbars are tested. The calcium pressure is adapted to have a stable interface. The

circularity and the aspect ratio are reported in figure 9. Both parameters indicates that the optimal parameters are : a pressure of oil of 500mbars with a pre-gelation time of 15s. Results clearly show the importance of pre-gelation on capsule sphericity.

Finally, for these optimized parameters (Poil = 500mbars, and 3% concentration of pre-gelling agent), the influence of the interface position on the capsule sphericity was assessed. As shown earlier, the position of the interface depends on the couple of pressures of oil and calcium. For a fixed oil pressure of 500mbars, calcium pressure varied from 450mbars to 650mbars. Results are shown on figure 10. Not many variation is measurable either on circularity or aspect ratio meaning that previous optimized parameters provide sufficient pre-gelled droplet to cross the interface in a large range of calcium pressure. The impact on the capsule shape is negligible.

## 5 CONCLUSION

This novel microsystem allows the automated production of alginate capsules. We have optimized the pre gelation process and the flow parameters to keep the initial monodispersity and sphericity of the alginate droplets produced with the MFFD junction. This novel device works continuously for 2h at a frequency up to 200 droplets per minute. The process has been already tested for Jurkat cell encapsulation showing good result of viability.

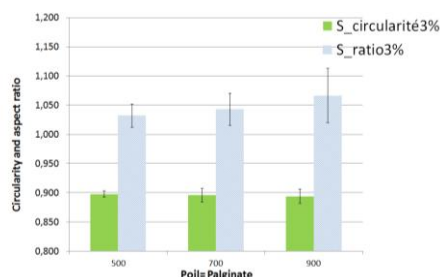


Figure 9 : Evolution of the shape of the capsules in function of the time of pre gelation

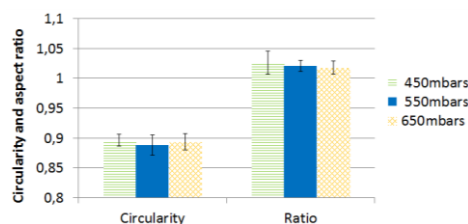


Figure 10 : Evolution of the shape of the capsules in function of the pressure of calcium

## REFERENCES

- [1] P. de Vos, M. Bucko, P. Gemeiner, M. Navratil, J. Svitel, M. Faas, B. L. Strand, G. Skjak-Braek, Y. A. Morch, A. Vikartovska, I. Lacik, G. Kollarikova, G. Orive, D. Poncelet, J. L. Pedraz, et M. B. Ansorge-Schumacher, *Biomaterials*, vol. 30, n°. 13, p. 2559–2570, mai 2009.
- [2] F. Lim et A. Sun, *Science*, vol. 210, n°. 4472, p. 908–910, 1980.
- [3] Y. C. Tan, V. Cristini, et A. P. Lee, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 114, n°. 1, p. 350–356, 2006.

- [4] H. Zhang, E. Tumarkin, R. M. A. Sullan, G. C. Walker, et E. Kumacheva, *Macromolecular rapid communications*, vol. 28, n°. 5, p. 527–538, 2007.
- [5] J. Berthier, S. Levot, et F. Rivera, « Patent WO2010146261 ».
- [6] « ImageJ software: <http://rsbweb.nih.gov/ij/> ».
- [7] J. Berthier, S. Le Vot, P. Tiquet, N. David, D. Lauro, P. Y. Benhamou, et F. Rivera, *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 158, n°. 1, p. 140–148, mars 2010.
- [8] P. Dalle, J. Berthier, R. Renaudot, S. Morales, N. David, G. Costa, M. Alessio, P. Caillat, P.-Y. Benhamou, et Rivera, F., *Proceedings of the 2nd European Conference on Microfluidics*, Toulouse, 08-déc-2010.